



Cátia Maria Geralda dos Santos Nascimento

**Fatores de virulência e sensibilidade antimicrobiana de *Plesiomonas*
shigelloides isoladas de água de rio**

**CAMPINAS
2012**



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS**

Cátia Maria Geralda dos Santos Nascimento

**Fatores de virulência e sensibilidade antimicrobiana de *Plesiomonas*
shigelloides isoladas de água de rio**

Orientador(a): Prof. Dr. Tomomasa Yano

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade de Campinas para obtenção de título de Mestre em Clínica Médica, área de concentração Clínica Médica.

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA ALUNA CÁTIA MARIA GERALDA DOS SANTOS NASCIMENTO E ORIENTADA PELO PROF. DR. TOMOMASA YANO.

Assinatura do Orientador

**CAMPINAS
2012**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
MARISTELLA SOARES DOS SANTOS – CRB8/8402
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP

N17f

Nascimento, Cátia Maria Geralda dos Santos, 1971-
Fatores de virulência e sensibilidade antimicrobiana
de *Plesiomonas shigelloides* isoladas de água de rio /
Cátia Maria Geralda dos Santos Nascimento. --
Campinas, SP : [s.n.], 2012.

Orientador : Tomomasa Yano.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Vacúolos. 2. Hemólise. 3. Adesão celular. 4.
Lipase. 5. Peptídeo hidrolases. I. Yano, Tomomasa,
1941-. II. Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Virulence factors and antimicrobial susceptibility of *Plesiomonas shigelloides* isolated from river water

Palavras-chave em inglês:

Vacuoles

Hemolysis

Cell adhesion

Lipase

Peptide hydrolases

Área de concentração: Clínica Médica

Titulação: Mestra em Clínica Médica

Banca examinadora:

Tomomasa Yano [Orientador]

Luciano Moura Martins

Marcelo Fabiano Gomes Boriollo

Data da defesa: 21-11-2012

Programa de Pós-Graduação: Clínica Médica

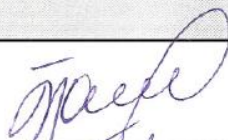
**COMISSÃO EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE
MESTRADO**

CÁTIA MARIA GERALDA DOS SANTOS NASCIMENTO (RA: 089641)

Orientador (a) PROF(A). DR(A). TOMOMASA YANO

Membros:

1. PROF(A). DR(A). TOMOMASA YANO



2. PROF(A). DR(A). LUCIANO MOURA MARTINS



3. PROF(A). DR(A). MARCELO FABIANO GOMES BORIOLLO



Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas

Data: 21 de novembro de 2012

AGRADECIMENTOS

A Deus pela proteção e força para trilhar os caminhos que somente eu preciso percorrer para crescer como pessoa.

Ao meu querido esposo Francisco, pela imensa paciência, compreensão e apoio em todos os momentos desta caminhada.

A minha mãe Trindade pelo seu imenso amor e carinho, ao meu pai Sebastião (*in memoriam*) que sempre será meu exemplo de fé e persistência e a minha irmã Carla pelo carinho e apoio.

Ao Prof. Dr. Tomomasa Yano pela oportunidade e orientação na realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Hernandes Faustino Carvalho e seus alunos de pós Guilherme e Danilo pela ajuda e disponibilidade do laboratório.

A Prof^a Dra. Ângela Von Nowakonski do Laboratório de Microbiologia Clínica do HC e a funcionária Maria Rita pela ajuda e disponibilidade.

A minha amiga Luciana Oliveira pela amizade, sinceridade e ajuda sempre que precisei.

Aos amigos de laboratório Robert, Cláudia Yano, Rogério, Mayara, Natália, Rebeca, Lucinha, Luciano e Cláudio Amorim pelos momentos de alegria e pela ajuda na realização deste trabalho.

As queridas Ana Stella Menegon Degrossoli e Ana Lúcia Rodrigues Soledade pela amizade e disponibilidade em ajudar.

Ao Paulinho do Laboratório de Química de Proteínas pela ajuda e contínua disponibilidade.

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pelo suporte financeiro para a realização deste trabalho.

RESUMO

Neste estudo foram analisadas oito isolados de *Plesiomonas shigelloides*, obtidos da bacterioteca do Laboratório de Fatores de Virulência em Bactérias, Instituto de Biologia –UNICAMP – Campinas/SP: sete isolados são provenientes de água doce do Rio Cambé na região de Londrina/PR e, um isolado de ATCC 14029. Os sobrenadantes de culturas de *P. shigelloides* foram capazes de induzir efeitos anticarcinogênicos *in vitro* (em células He-La e HEP-2), apesar de apresentarem efeitos citotóxicos em linhagens celulares não cancerígenas (em células CHO e Vero). A atividade hemolítica dos cultivos de *P. shigelloides* foi detectada em placas com ágar sangue (meio sólido) e em microplaca (meio líquido) contendo hemácias de carneiro. A atividade citotóxica e hemolítica de *Plesiomonas shigelloides* apresenta característica de termolabilidade. Os isolados de *P. shigelloides* aderiram em células HEP-2 e em superfícies inertes como o plástico (microplaca de poliestireno) e vidro (lamínula) e, ainda apresentaram a capacidade de formar biofilme *in vitro*, sendo possível a colonização e formação de biofilmes em células epiteliais e em dispositivos médicos implantáveis como cateteres, próteses e/ou sondas. A produção de exoenzimas hidrolíticas como lipase e proteases (caseinase e elastase) foi detectada nos isolados de *P. shigelloides*. No teste de sensibilidade antimicrobiana pelo método de difusão de discos, os isolados de *P. shigelloides* se mostraram sensíveis à maioria dos antibióticos utilizados. Entretanto, outros testes de sensibilidade antimicrobiana se tornam necessários de modo a assegurar uma terapia antibiótica eficiente em casos de confirmação de diagnóstico clínico microbiológico. Neste estudo, os isolados de *P. shigelloides* expressaram fatores de virulência *in vitro* como citotoxicidade, adesão, exoenzimas e resistência antimicrobiana que podem potencialmente estar envolvidos na sua patogenicidade, de modo especial às gastroenterites ou complicações extra-intestinais (septicemia) em indivíduos imunocomprometidos (HIV-soropositivo, câncer ou ainda doenças hepatobiliares).

ABSTRACT

We analyzed eight isolates *Plesiomonas shigelloides*, obtained from the bacterial collection Laboratory of Virulence Factors in Bacteria, Biology Institute – UNICAMP – Campinas/SP: seven isolates are from freshwater in Cambé River, region of Londrina/PR and a isolate ATCC 14029. The culture supernatants *P. shigelloides* were able to induce anticarcinogenic effects *in vitro* (He-La and HEP-2 cells), although having cytotoxic effects on non-cancer cell lines (CHO and Vero cells). The hemolytic activity of cultures *P. shigelloides* was detected on blood agar plates (solid medium) and microplates (liquid medium) containing sheep erythrocytes. The hemolytic and cytotoxic activity *P. shigelloides* features characteristics of thermo ability. Isolates *P. shigelloides* joined in HEP-2 cells and inert surfaces such as plastic (polystyrene microplate) and glass (coverslips) and also had the ability to form biofilm *in vitro*, it being possible colonization and biofilm formation in epithelial cells and devices implantable medical devices such as catheters, implants and/or probes. The production of hydrolytic exoenzymes such as lipase and protease (caseinase and elastase) was detected in isolates *P. shigelloides*. In antimicrobial susceptibility testing by the disc diffusion method, isolates *P. shigelloides* were sensitive to most antibiotics. However, other antimicrobial susceptibility testing has become necessary to ensure efficient antibiotic therapy in cases of clinical diagnostic microbiological confirmation. In this study, isolates *P. shigelloides* expressed virulence factors *in vitro* as cytotoxicity, adhesion, exoenzymes and antimicrobial resistance that may potentially be involved in this pathogenicity, specially to gastroenteritis or extraintestinal complications (septicemia) in immunocompromised individuals (HIV-seropositive, cancer or diseases hepatobiliary).

LISTA DE ABREVIATURAS

ACRP	Anti-cholera toxin antibody (Anticorpo anti-toxina da cólera)
AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism (Polimorfismo no comprimento de fragmentos amplificados)
ATCC	American Type Culture Collection (Coleção americana de cultura de células)
AZ	Azul de Toluidina
Caco-2	Human colon carcinoma (Carcinoma de cólon humano)
CHO	Chinese hamster ovary (Ovário de hamster chinês)
CIM	Concentração inibitória mínima
CT	Cholera toxin (Toxina colérica)
He-La	Henrietta Lacks cervical carcinoma (Carcinoma cervical de Henrietta Lacks)
HEp-2	Human laryngeal carcinoma (Carcinoma de laringe humana)
HT-29	Colorectal adenocarcinoma (Adenocarcinoma colorretal)
LB	Meio Luria Bertani
LT	Heat labile toxin (Toxina termolábil)
LPS	Lipopolysaccharide (Lipopolissacarídeo)
MDa	Megadaltons
MEM	Meio Mínimo Essencial Eagle
PBS	Phosphate buffer saline (Tampão fosfato salina)
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonil
407	Epithelium intestine human (Epitélio de intestino humano)
SAP	Secreted aspartic proteinases (Aspartil proteinase secretada)
SFB	Soro fetal bovino
ST	Heat stable toxin (Toxina termo-estável)
TSB	Tryptic Soy Broth (Caldo Trípico de Soja)

U-397	Human macrophages (Macrófagos humanos)
Vero	African green monkey kidney (Rim de macaco verde Africano)
Y1	Adrenal tumor mouse (Células adrenais tumorais de camundongo)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Efeito citotóxico sobre células induzido pelo sobrenadante de cultivo de <i>P. shigelloides</i>	36
Figura 2 - Adesão do isolado de <i>P. shigelloides</i> 9P3-1 em células Hep-2	40
Figura 3 - Adesão de isolados de <i>P. shigelloides</i> em superfície de vidro (lamínula)	41
Figura 4 – Efeito citotóxico sobre células Vero induzido pelo sobrenadante de cultivo de <i>P. shigelloides</i>	41
Figura 5 - Distribuição de isolados de <i>P. shigelloides</i> quanto à detecção de enzimas extracelulares	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Padrão interpretativo das zonas de inibição dos antimicrobianos utilizados	34
Tabela 2 - Atividade citotóxica em células CHO, Vero, He-La e HEp-2	36
Tabela 3 - Atividade citotóxica em células Veras	38
Tabela 4 - Atividade hemolítica em placas com ágar sangue	38
Tabela 5 - Atividade hemolítica em microplacas	39
Tabela 6 - Formação de biofilme <i>in vitro</i>	40
Tabela 7 - Adesão em células HEp-2	40
Tabela 8 - Adesão em superfície de plástico e de vidro	41
Tabela 9 - Detecção de atividade enzimática	42
Tabela 10 - Sensibilidade antimicrobiana dos isolados de <i>P. shigelloides</i>	43
Tabela 11 - Percentual de isolados de <i>P. shigelloides</i> com perfil sensível, intermediário e resistente aos antimicrobianos utilizados	44
Tabela 12 - Multirresistência antimicrobiana do isolado de <i>P. shigelloides</i> 1P3-16	44

SUMÁRIO

1.	Introdução	16
2.	Objetivos	24
3.	Material e Métodos	26
3.1.	Isolados bacterianos	27
3.2.	Condições de cultivo	27
3.3.	Detecção da atividade citotóxica	27
3.3.1.	Preparo das culturas celulares	27
3.3.2.	Teste de citotoxicidade	28
3.3.3.	Efeito da proteinase K na atividade citotóxica	28
3.4.	Detecção da atividade hemolítica	28
3.4.1.	Hemólise em placa com ágar sangue	28
3.4.2.	Hemólise em microplaca	29
3.5.	Ensaio de termoestabilidade	29
3.6.	Formação de biofilme <i>in vitro</i>	29
3.7.	Ensaio de adesão em células Hep-2	30
3.7.1.	Ensaio de adesão em plástico e vidro	31
3.8.	Estudo das alterações celulares	31
3.8.1.	Azul de Toluidina	31
3.9.	Detecção da atividade enzimática	31
3.9.1.	Lipase	32
3.9.2.	Caseinase	32
3.9.3.	Elastase	32
3.9.4.	Gelatinase	32
4.	Sensibilidade antimicrobiana	33
5.	Resultados	35
5.1.	Teste de citotoxicidade	36
5.1.2.	Efeito da proteinase K na atividade citotóxica	37

5.2.	Detecção da atividade hemolítica	38
5.2.1.	Hemólise em placa com ágar sangue	38
5.2.2.	Hemólise em microplaca	38
5.3.	Ensaio de termoestabilidade	39
5.4.	Formação de biofilme <i>in vitro</i>	39
5.5.	Ensaio de adesão em células Hep-2	39
5.5.1.	Ensaio de adesão em plástico e vidro	40
5.6.	Estudo das alterações celulares	41
5.7.	Detecção da atividade enzimática	42
5.8.	Sensibilidade antimicrobiana	43
6.	Discussão	45
7.	Conclusões	51
8.	Referências	53

1. Introdução

Plesiomonas shigelloides foi denominada de C27 por Ferguson e Henderson (1947) que a isolaram pela primeira vez a partir de fezes de humano (1). Esses autores descreveram *P. shigelloides* como uma bactéria móvel, cujo antígeno somático apresentava similaridade ao antígeno de *Shigella sonnei*, mas com características morfológicas (motilidade) e bioquímicas (fermentação tardia da lactose, não produção de ácido a partir de D-manitol e produção de indol) distintas (2).

A bactéria foi incluída no gênero *Pseudomonas* e espécie *shigelloides* por apresentar flagelação polar e características semelhantes à *Shigella*. Posteriormente foi denominada *Aeromonas shigelloides* e pertencente ao gênero *Aeromonas*, família *Vibrionaceae*, por apresentar metabolismo fermentativo, morfologia (flagelos) e características bioquímicas similares com *Aeromonas* (3). Foi proposta finalmente a criação de um novo gênero *Plesiomonas* com a única espécie *shigelloides* dentro da família *Vibrionaceae* (4).

Estudos moleculares como a análise das sequências de nucleotídeos de RNA ribossomal 5S e 16S, mostraram que *P. shigelloides* está mais próxima de bactérias do gênero *Proteus*, que dos membros da família *Vibrionaceae*, o que sugere uma relação filogenética de *P. shigelloides* com a família *Enterobacteriaceae* (4,5). Adicionalmente, Huys & Sings (6) genotiparam linhagens de *Aeromonas* spp. por AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) e verificaram que *P. shigelloides* posicionou-se fora do principal *cluster* formado por *Aeromonas*. Devido a esses achados, o gênero *Plesiomonas* foi alocado na família *Enterobacteriaceae* como mencionado na última edição do Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (3).

P. shigelloides é um bacilo Gram-negativo, anaeróbio facultativo, não formador de esporos, com motilidade por flagelos polares, catalase positivo e o único oxidase positivo dentro da família *Enterobacteriaceae*. Realiza a fermentação de glicose sem produção de gás, produção de ácido a partir do inositol, descarboxila a lisina e a ornitina, dihidroliza a arginina e apresenta sensibilidade ao agente Vibriostático 0/129 (4,7). A sorovariedade de *P. shigelloides* é definida por um esquema internacional de 102 antígenos somáticos (O) e 51 flagelares (H) (8). Existindo a reação cruzada com alguns sorotipos somáticos do gênero *Shigella* (4,9).

A temperatura de crescimento desta bactéria está entre 8 e 44 °C, sendo a melhor entre 35 e 38 °C e em pH entre 4 e 9. Muitos isolados apresentam bom crescimento em meio contendo concentrações de 2,0 a 3,0% de NaCl e alguns ainda toleram concentrações de até 5% de sal (10, 11).

O principal habitat é o ambiente aquático como rios, lagos e mares (12, 13), mas também se encontra amplamente distribuída na natureza (14). Animais aquáticos como peixes, camarão, ostras e mariscos são colonizados por esta bactéria, sendo também encontrada em aves, anfíbios, reptéis, suínos e bovinos e em animais domésticos como cães e gatos (11, 15, 16). A incidência de isolamento dessa bactéria é baixa em indivíduos saudáveis, contudo, *P. shigelloides* não faz parte da microbiota intestinal humana (11).

A ocorrência de *P. shigelloides* é comum em áreas de clima tropical e subtropical como Japão, Tailândia, África, Cuba e Peru (17, 18, 19). No entanto, existem relatos do seu isolamento em locais de clima frio como na região central da Europa e em lagos localizados no norte do Círculo Polar (12, 20).

Em casos esporádicos de infecções intestinais e surtos de diarreia relatados em várias partes do mundo, *P. shigelloides* aparece como agente etiológico, indicando sua enteropatogenicidade para o homem. Os surtos de diarreia são relatados principalmente em países tropicais e subtropicais. As infecções intestinais associadas a esta bactéria apresentam uma característica de sazonalidade, ou seja, os picos de infecções ocorrem durante os meses quentes (21, 22, 23, 24, 25).

No Japão, em 1973, foi relatado que aproximadamente 1000 pessoas foram acometidas por um surto de diarreia pelo consumo de água possivelmente contaminada por *P. shigelloides* (26). Nos Estados Unidos, em 1980, relatou-se pela primeira vez um quadro de infecção alimentar devido o consumo de ostras contaminadas por *P. shigelloides* na Carolina do Norte (27).

Em 1990, no Peru, *P. shigelloides* foi isolada de fezes de crianças com diarreia (23). Entre os anos de 1990 e 1998, foi relatado em Cuba, o isolamento de *P. shigelloides* a partir de fezes diarreicas de pacientes e ainda o isolamento a partir do líquido de um paciente falecido, devido a um quadro de meningite (28). No sul da Índia, na Nigéria entre 1993 e 1994, Obi et al. (29) relataram a presença de *P. shigelloides* isolada principalmente de fezes diarreica de pacientes da

área rural. De acordo com Wong *et al.* (30), durante os anos de 1995 e 1998 em Hong Kong, *P. shigelloides* foi isolada de fezes diarreicas de pacientes com histórico de consumo de alimentos crus e frutos do mar e, de pacientes que viajaram para fora de Hong Kong.

Nas últimas décadas no Brasil, os relatos de ocorrência de *P. shigelloides* são poucos. Mondino *et al.* (13) reportaram no Rio de Janeiro, em 1990, o isolamento de *P. shigelloides* a partir de diferentes tipos de água, como água doce poluída e não poluída e ainda água salgada. Na região do norte do Paraná, entre 1992 e 1993, foi relatada por Gibotti *et al.* (31) a presença de *P. shigelloides*, *Aeromonas* spp. e *Vibrio cholerae* em amostras de água doce do Rio Cambé.

A infecção por este microrganismo no homem está associada à ingestão de alimentos marinhos crus e consumo de água e/ou alimentos contaminados, causando infecção intestinal, principalmente em indivíduos que vivem ou viajam para países tropicais (22, 25).

A infecção intestinal comumente relacionada com infecção por *P. shigelloides* é a gastroenterite, e a diarreia é o sintoma predominante associado a outros como cólicas abdominais, náuseas e/ou vômitos, calafrios, dor de cabeça, e algum grau de desidratação (32, 33).

A diarreia pode ocorrer de três formas: secretória, na presença de sangue e muco e, na forma semelhante à colera. A diarreia secretória é a forma mais comumente reportada com duração entre 1 a 7 dias e que pode persistir por até 3 semanas. A outra forma de diarreia assemelha-se ao quadro de shigellose, pela presença de sangue e muco nas fezes e com tempo de duração de 2 a 3 semanas. A diarreia considerada crônica, assemelha-se à cólera causada por *V. cholerae*, com sintomas tais como cólicas abdominais intensas, dores de cabeça, calafrios e náuseas (17, 33, 34).

A gastroenterite por *P. shigelloides* geralmente é auto-limitada, com tratamento dos sintomas como por exemplo a desidratação e, a terapia antimicrobiana é necessária em casos mais graves de gastroenterite (34), em pacientes imunossuprimidos e nos casos de infecções extra-intestinais (35, 36, 37, 38, 39).

As infecções extra-intestinais por *P. shigelloides* envolvem casos de septicemia, meningite, artrite, infecções intra-abdominais como colicistite, pseudoapendicite, infecções oculares como endoftalmite e casos de osteomielite, celulite e pneumonia (40, 41, 42, 43, 44, 45). A septicemia por *P. shigelloides* é a infecção extra-intestinal relatada com mais frequência, sendo

frequência, sendo fatal na maioria dos casos. Encontrada principalmente em pessoas imunodeprimidas e em recém-nascidos (36, 40, 47) em indivíduos com doenças hepáticas e hematológicas como por exemplo, a talassemia e ainda casos de leucemia (47, 48, 49). A meningite por *P. shigelloides* acomete principalmente os recém-nascidos (50) e quando acompanhada por septicemia apresenta uma alta taxa de morbidade e mortalidade (41, 43).

Estudos sugerem que *P. shigelloides* seja enteropatogênica (23, 43, 51) para o homem. São diversos os relatos quanto à produção de enterotoxinas, hemolisinas, citotoxinas, propriedades de adesão e enzimas extracelulares (51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58), no entanto, a patogenicidade de *P. shigelloides* não está bem clara (23, 51,59).

A habilidade da bactéria de aderir e colonizar superfícies celulares do hospedeiro é fundamental para o início de uma infecção e, a presença de estruturas como fímbrias, flagelos ou glicocálice em muitos patógenos entéricos, facilita a adesão às células do hospedeiro. A adesão e invasão por *P. shigelloides* em culturas de células Caco-2 foi relatada por Theodoropoulos *et al.* (55), onde se observou pela primeira vez a presença de estruturas semelhantes às fímbrias.

Além da capacidade de adesão e invasão celular, *P. shigelloides* também induziu apoptose em uma linhagem celular de tumor de cólon humano, as células Caco-2, como demonstrado por Tsugawa *et al.* (60). Olvick *et al.* (23) observaram a capacidade de invasão por *P. shigelloides* em células HeLa, uma linhagem celular tumoral de cérvix humano.

Enteropatógenos como *Shigella* e *E. coli* possuem um plasmídeo de 140MDa que está associado á colonização e invasão do trato intestinal. Estudos sugerem que um plasmídeo de virulência esteja envolvido na patogenicidade de *P. shigelloides* (51, 61). Holmberg *et al.* (33), encontraram em amostras de *P. shigelloides* de pacientes com infecções entéricas, apenas um plasmídeo com alta massa molecular (>150MDa, ~230Kb), diferente dos plasmídeos encontrados em *Shigella* spp. e em *E. coli* enteroinvasora.

Biofilme bacteriano é uma comunidade complexa e estruturada de microrganismos, envoltos por uma matriz extracelular de polissacarídeos, aderidos entre si a uma superfície ou interface. Uma vez que o biofilme é constituído de agregados de células, estas se comunicam através de um processo chamado “*quorum sensing*” (62). Hostacká *et al.* (63) reportaram que amostras de *P. shigelloides* isoladas de seres humanos e animais foram capazes de produzir biofilme *in vitro*.

As enterotoxinas produzidas por *P. shigelloides* têm sido descritas como potenciais fatores de virulência, mas a patogenicidade deste microrganismo ainda não está bem definida. Sanyal *et al.* (64) demonstraram a produção de uma enterotoxina termoestável (ST) *in vivo* pela indução de acúmulo de fluido com o teste de alça ligada de coelho. O mesmo resultado não foi observado por Herrington *et al.* (51).

Enterotoxinas termolábil (LT) e termoestável (ST) foram caracterizadas e parcialmente purificadas por Manorama *et al.* (65). Uma enterotoxina termoestável sem qualquer homologia com os genes das enterotoxinas de *E. coli* e *Vibrio cholerae* foi descrita por Matthews *et al.* (66), sugerindo que esta toxina é um novo tipo de toxina estável. Foi reportado por Gardner *et al.* (54), a produção de uma toxina termolábil capaz de causar alongamento em células CHO, efeito similar produzido pela toxina colérica de *V. cholerae*, quando *P. shigelloides* é cultivada em meio de cultura pobre em ferro. A neutralização do efeito de alongamento em células CHO ocorre pela incubação da toxina com soro anti-toxina colérica. No experimento realizado por Olsvik *et al.* (23), *P. shigelloides* não apresentou homologia através de estudos com sondas genéticas de DNA para as enterotoxinas LT, CT, STa e STb, sugerindo que as enterotoxinas presentes em *P. shigelloides* têm mecanismos de ação desconhecidos.

A hemolisina é considerada um fator de virulência por causar a lise dos eritrócitos e de outras células como fibroblastos humanos, monócitos, granulócitos e células endoteliais (67, 68). Alguns estudos sugerem que a composição do meio de cultura, a regulação de ferro e a presença de cálcio podem influenciar na produção de β -hemolisina por *P. shigelloides* (53, 56). Daskaleros *et al.* (69) reportaram que a hemolisina de *P. shigelloides* parece ter sua síntese regulada em parte por íons de ferro. Santos *et al.* (53) detectaram em *P. shigelloides*, a atividade hemolítica extracelular usando meio de cultura TSB carente de ferro.

Outros fatores como tensão de oxigênio e viscosidade parecem influenciar a expressão de hemolisina em *P. shigelloides*. De acordo com estudos de Daskaleros *et al.* (69), a atividade hemolítica não foi observada quando colônias bacterianas foram crescidas na superfície de placas com ágar sangue, no entanto, a hemólise foi detectada em meios líquido ou semi-sólido. Janda e Abbott (70) reportaram que amostras de *P. shigelloides* apresentaram atividade hemolítica em placas de ágar sangue de carneiro, porco, coelho e boi. A β -hemolisina apresentou características de uma proteína, sendo inativada por proteases e altas temperaturas.

A citolisina é um fator de virulência presente em muitos patógenos entéricos, responsável pela colonização e/ou invasão de células. O efeito citotóxico de *P. shigelloides* em várias linhagens de células tem sido mostrado em vários estudos. Abbot *et al.* (71) demonstraram a presença de uma toxina estável ao calor (100°C, 10 minutos) com efeitos citotóxicos em células HEp-2 e Y1, causando arredondamento destas células antes da morte.

A presença de uma citotoxina semelhante à toxina colérica foi detectada por Gardner *et al.* (54) através do cultivo de *P. shigelloides* em meio de cultura pobre em ferro. Esta citotoxina causou alongamento sobre células CHO, efeito similar produzido pela toxina colérica de *V. cholerae* e, a ação da citotoxina de *P. shigelloides* foi neutralizada pela anti-toxina colérica. Segundo outro estudo de Gardner *et al.* (72), o efeito de alongamento sobre célula CHO é perdido quando *P. shigelloides* é cultivada em meio rico em ferro. Okawa *et al.* (58) purificaram uma citotoxina termoestável (ACRP-LPS), composta por um complexo de 3 moléculas proteicas e LPS, com atividade citotóxica em células CHO, Caco-2, 407 e U-397. A atividade citotóxica desta toxina foi parcialmente perdida após tratamento com proteinase K.

Estudos realizados por Fálcon *et al.* (57), mostraram que *P. shigelloides* produz uma citotoxina com atividade vacuolizante em células Vero, CHO, He-La e HT29. A citotoxina vacuolizante também apresenta atividade hemolítica e enterotóxica. Essa citotoxina também é termoestável a 56°C por 30 minutos, este resultado é semelhante ao da citotoxina termolábil de *A. hydrophila* (73) e diferente da enterotoxina termolábil de *E. coli* (74). O anti-soro contra a enterotoxina citotóxica de *A. hydrophila* neutraliza a atividade citotóxica desta toxina de *P. shigelloides*.

A produção de enzimas extracelulares como β -lactamases, enterotoxinas hemolíticas, proteases, lípases e nucleases podem contribuir para a patogenicidade de *Aeromonas* spp. (75). As proteases podem degradar proteínas que funcionam na manutenção da integridade do tecido e proteínas responsáveis pela defesa do hospedeiro (76, 77). Lipases de *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* podem ser produzidas durante o processo de infecção bacteriana. Sendo demonstrado *in vitro*, que as lipases podem comprometer a função de diferentes tipos de células envolvidas na resposta imune humana como macrófagos ou plaquetas (78, 79). A produção de enzimas extracelulares também está diretamente relacionada ao poder de virulência e patogenicidade de *Candida albicans*, sendo aspartil proteinases (Saps) e fosfolipases as mais

importantes enzimas hidrolíticas produzidas por esta levedura (80).

A produção de enzimas extracelulares por *P. shigelloides* é pouco relatada. A atividade enzimática foi detectada em culturas de *P. shigelloides* por Santos *et al.* (53), que reportaram a presença de elastase, uma protease com habilidade de degradar o tecido conectivo, contribuindo para a patogenicidade bacteriana. Salerno *et al.* (81) detectaram em amostras de *P. shigelloides* a produção de gelatinase, uma protease que hidrolisa gelatina, colágeno e caseína e pode estar envolvida em processos inflamatórios.

São vários os estudos que apontam *P. shigelloides* como um agente etiológico em infecções intestinais e extra-intestinais (23, 34, 51). Neste estudo, o objetivo foi detectar possíveis fatores de virulência em isolados de *P. shigelloides* e verificar o perfil de sensibilidade antimicrobiana.

2. Objetivos Gerais

Neste trabalho o objetivo foi verificar o perfil de sensibilidade antimicrobiana e detectar fatores de virulência em isolados de *Plesiomonas shigelloides*, visando compreender a patogenicidade desta bactéria.

2.1 Objetivos específicos:

Verificar o perfil de sensibilidade antimicrobiana através do método de difusão de discos.

Estudar as propriedades de virulência em *Plesiomonas shigelloides* através de:

- a) Detecção de atividades citotóxica e hemolítica;
- b) Detecção de enzimas extracelulares;
- c) Adesão à superfície celular, plástico (microplaca de poliestireno) e vidro (lamínulas);
- d) Formação de biofilme *in vitro*.

3. Material e Métodos

3.1 Isolados bacterianos

Neste estudo foram analisadas oito isolados de *Plesiomonas shigelloides*, obtidos da bacterioteca do Laboratório de Fatores de Virulência em Bactérias, Instituto de Biologia – UNICAMP: sete isolados são provenientes de água doce do Rio Cambé na região de Londrina/PR: 1P2-13, 1P3-16, 8P1-4, 8P6-5, 9P1-1, 9P3-1 e 9P7-5 (56) e um isolado de *P. shigelloides* ATCC 14029.

3.2 Condições de cultivo

Os isolados de *P. shigelloides* foram cultivados em meio de cultura LB pH 7.4 por 14 horas a 37°C sob agitação de 100 rpm (Controlled Environment Incubator Shaker). Os cultivos bacterianos foram centrifugados por 15 minutos a 10.000 rpm (Beckman – Model J2-21 Centrifuge). Os sobrenadantes foram filtrados através de membranas de 0,22 µm (Millipore, EUA) e armazenados a -20°C para ensaios futuros (82).

3.3 Detecção da atividade citotóxica

3.3.1 Preparo das culturas celulares

As células CHO, Vero, He-La e HEp-2, provenientes da coleção de cultura do Laboratório de Cultura Celular, Departamento de Genética e Evolução e Bioagentes, Instituto de Biologia - UNICAMP, foram cultivadas em garrafas de cultura de células (CTE), contendo meio MEM (meio mínimo essencial de Eagle) (Cultilab) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO), e 1% de solução de antibióticos (penicilina 1000 U/mL e estreptomicina 250µg/mL) (Sigma Chemical Co.). As células foram removidas das garrafas com tripsina-EDTA e ressuspensas em meio MEM para um número estimado de $2,5 \times 10^5$ células/mL. Adicionou-se 100 µL da suspensão de células em placas de 96 poços e após formação das monocamadas celulares, as mesmas foram utilizadas para a análise de ensaios de atividade citotóxica (83).

3.3.2 Teste de citotoxicidade

O volume de 100µL dos sobrenadantes dos cultivos de *P. shigelloides* foram aplicados em microplacas com culturas celulares de CHO, Vero, He-La e HEp-2, com diluições recíprocas de razão 2. As microplacas foram incubadas a 37°C em estufa com 5% de CO₂ e a leitura dos resultados foi realizada após 1, 2, 4, 12 e 24 horas de incubação, com o auxílio de microscópio invertido (Nikon Instrumentes, Japan) (84). A reprodutibilidade do ensaio foi assegurada com o uso do sobrenadante de cultura de *Aeromonas hydrophila* AH191 que apresenta atividade citotóxica (73).

3.3.3 Efeito de proteinase K na atividade citotóxica

Os sobrenadantes de cultura bacteriana de *P. shigelloides* foram tratados com proteinase K (100 µg/mL) (Sigma) a 37°C por 5 horas (84). A ação da proteinase K foi interrompida pela adição do inibidor PMSF (5mM) por 1 hora. A atividade citotóxica residual foi verificada sobre células Vero, conforme item 3.3.2. Sobrenadantes de cultura de *P. shigelloides* não tratados com proteinase K foram utilizados como controle da presença de atividade citotóxica para garantir a reprodutibilidade do ensaio.

3.4 Detecção da atividade hemolítica

3.4.1 Hemólise em placa com ágar sangue

Os cultivos de *P. shigelloides* foram semeados por estria superficial e em profundidade em placas com ágar Sangue Base (Sigma) contendo 5% de hemácias de carneiro (Microlab), segundo a metodologia de Morgan *et al.* (85) e incubadas por 24 horas a 37°C. O mesmo procedimento foi realizado com os sobrenadantes de cultivos bacterianos. A positividade da reação é verificada pela presença de halos de hemólise ao redor dos inóculos. A reprodutibilidade do ensaio foi verificada através da utilização do isolado de *A. hydrophila* AH191 que apresenta atividade hemolítica (73).

3.4.2 Hemólise em microplaca

O ensaio de hemólise em microplacas de poliestireno foi realizado conforme metodologia proposta por Burke *et al.* (86). As culturas bacterianas foram centrifugadas a 10.000 rpm por 15 minutos e os “pellets” foram lavados três vezes com tampão PBS pH7.4 e ressuspensos no mesmo tampão. Alíquotas de 100 µL do sobrenadante de cultura e 100 µL da suspensão bacteriana (3×10^8 bactérias/mL) foram aplicados com diluições recíprocas de razão 2, em microplacas contendo 100 µL de suspensão de hemácias de carneiro a uma concentração de 1%. As placas foram incubadas a 37°C por 1 hora e em seguida a 4°C *overnight*. O título é expresso como a recíproca da maior diluição capaz de provocar a lise de 50% das hemácias e a visualização da presença de hemólise é possível sem o auxílio de microscópio. O tampão PBS pH 7.4 e o detergente Triton X-100 a 0,1% (Sigma) foram utilizados como controles da ausência e presença de hemólise, respectivamente, de modo a assegurar a reprodutibilidade do ensaio e a comparação dos resultados.

3.5 Ensaio de termoestabilidade

A fim de verificar se a atividade biológica presente nos sobrenadantes de cultura de *P. shigelloides* é termoestável ou não, os mesmos foram aquecidos a 56 e 100° C por 15 minutos (57) e resfriados à temperatura ambiente para análise da atividade citotóxica sobre células Vero, conforme item 3.3.2 e da atividade hemolítica, conforme item 3.4.2.

3.6 Formação de biofilme *in vitro*

A realização do ensaio de biofilme foi baseada na metodologia proposta por Wakimoto *et al.* (87). Dos isolados de *P. shigelloides* cultivadas, 1 mL de cada suspensão foi centrifugada a 10.000 rpm por 15 minutos. Os “pellets” foram lavados em 1 mL de tampão PBS pH 7.4 por três vezes e foram ressuspensos no mesmo tampão de acordo com o tubo 1 da escala de MacFarland (3×10^8 bactérias/mL). Cinco microlitros dos “pellets” ressuspensos foram aplicados em microplaca de 96 poços contendo 200 µL de meio MEM. Após um período de

incubação de 24 horas a 37°C, as bactérias planctônicas foram removidas e foi adicionado 200 µL de cristal violeta (0,5%) (Nuclear) em cada poço, permanecendo por 5 minutos à temperatura ambiente. Após esse tempo, os poços foram lavados com água destilada e foi adicionado 200 µL de etanol 95%. O ensaio foi realizado em triplicata e a leitura da placa foi realizada em espectrofotômetro a 570_{nm} (OD₅₇₀). A OD₅₇₀ ≥0,1 em comparação ao branco indica positividade para a formação de biofilme. O isolado de *E. coli* enteropatogênica obtido da bacterioteca do Laboratório de Fatores de Virulência em Bactérias, Instituto de Biologia – UNICAMP, foi utilizado como controle da formação de biofilme para assegurar a reprodutibilidade do ensaio.

3.7 Ensaio de adesão em células HEp-2

As amostras de *P. shigelloides* foram cultivadas e 1 mL de cada suspensão foi centrifugada a 10.000 rpm por 15 minutos (microcentrífuga 1-14, Sigma, Alemanha). Os “pellets” foram, lavados em 1 mL de tampão PBS pH 7.4 por três vezes e foram ressuspensos no mesmo tampão de acordo com o tubo 1 da escala de MacFarland.

O ensaio de aderência em células HEp-2, foi realizado de acordo com a metodologia proposta por Scaletsky *et al.* (88) com algumas modificações. As células foram cultivadas em placas de 24 poços com lamínulas de vidro, contendo 1 mL de meio MEM com 10% de SFB, para um número estimado de 4x10⁵ células/mL e incubadas por 24 h a 37 °C, em atmosfera de 5% de CO₂. Após a formação da monocamada celular, as lamínulas foram lavadas, três vezes em PBS pH 7.4 e em cada poço foi adicionado 900 µL de meio com 2% de SFB e um inóculo de 100 µL dos “pellets” ressuspensos foram adicionados nos poços e as placas foram incubadas por 30 minutos a 37°C, em atmosfera de 5% de CO₂. Após esse período as lamínulas foram lavadas novamente 6 vezes em PBS e as células foram fixadas em paraformaldéido a 1,5% por 20 minutos a 4 °C e finalmente, coradas com Rosenfeld por 5 minutos e com Giemsa por 20 minutos. As lamínulas coradas foram montadas em lâminas de vidro e examinadas ao microscópio óptico de luz (400× e 1.000×). O ensaio foi realizado em duplicata e células HEp-2 não tratadas com os “pellets” ressuspensos foram utilizadas como parâmetro comparativo de crescimento.

3.7.1 Ensaio de adesão em plástico e em vidro

O ensaio de adesão também foi realizado em superfícies inertes como plástico (microplaca de poliestireno) e vidro (lamínulas) conforme item 3.7, porém na ausência de células HEp-2 (89).

3.8 Estudo das alterações celulares

Neste estudo, o ensaio com o corante Azul de Toluidina foi realizado com o objetivo de visualizar alterações celulares como o efeito de vacuolização induzido *P. shigelloides* sobre células Vero. Foram utilizadas microplacas de poliestireno de 24 poços com lamínulas de vidro. O sobrenadante de cultura do isolado de *P. shigelloides* 9P3-1 foi aplicado sobre células Vero, em diferentes períodos de tempo, 1, 2, 4, 12 e 24 horas, em duplicata. Em seguida as lamínulas foram lavadas com solução de PBS, fixadas por 1 hora com solução de formaldeído 10% (v/v) e lavadas com água destilada para retirar o excesso da solução fixadora. Células não tratadas com o sobrenadante de cultura do isolado 9P3-1 de *P. shigelloides* foram utilizadas como parâmetro comparativo de crescimento (57).

3.8.1 Azul de Toluidina

As células fixadas em lamínulas foram coradas com 0,25 % (w /v) de azul de toluidina (pH 4,0) por 15 minutos, e lavadas mais uma vez com água destilada. Após a secagem a temperatura ambiente, as lamínulas foram montadas em lâminas usando Entellan (Merck) e observadas em microscópio de luz (Zeiss, Alemanha), para a verificação das alterações celulares (57).

3.9 Detecção de atividade enzimática

Os isolados de *P. shigelloides* foram testados quanto à detecção de enzimas extracelulares como lípase e proteases (caseinase, elastase e gelatinase). O mesmo procedimento foi realizado com os sobrenadantes dos cultivos de *P. shigelloides*. A positividade da reação é verificada pela presença de halos ao redor dos inóculos. Os testes foram realizados em duplicata.

3.9.1 Lipase

A lipase é uma carboxiesterase capaz de hidrolisar triacilgliceróis em ácido graxos livres e glicerol (90).

Em placas contendo Ágar TSA (Difco Laboratories) e 1% de Tween-80 (Sigma), foi aplicado o volume de 10µL de cada suspensão bacteriana. As placas foram incubadas a 37°C por até 24 horas (91). O isolado de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 foi utilizado como controle da presença de atividade da lipase.

3.9.2 Caseinase

Este ensaio se baseia na capacidade da bactéria produzir a enzima caseinase, uma protease que hidrolisa a proteína caseína.

Um volume de 10µL de cada suspensão bacteriana foi aplicado em placas com Müeller-Hinton ágar (Merck), suplementado com 0,3% de caseína (Sigma). As placas foram incubadas a 37°C por até 48 horas (89). No controle da presença de atividade da caseinase foi utilizado o isolado de *Bacillus subtilis* ATCC 21332.

3.9.3 Elastase

A elastase é uma protease que degrada a elastina, uma proteína que é o principal componente do tecido conjuntivo.

Alíquotas de 10µL das suspensões bacterianas foram aplicadas em placas contendo Ágar Nutriente (Difco Laboratories) e 0,3% de elastina (Sigma). As placas foram incubadas a 37°C por até 48 horas (76). A detecção da elastase no ensaio foi assegurada pela utilização do isolado de *B. subtilis* ATCC 21332.

3.9.4 Gelatinase

A gelatinase é uma metalo-proteinase, capaz hidrolisar gelatina, colágeno, fibrinogênio e caseína.

Dez microlitros de cada cultura bacteriana foram aplicados em placas contendo Ágar Nutriente (Difco Laboratories) contendo 1% de Gelatina (Oxoid). As placas foram incubadas a 37°C por até 24 horas (91). O isolado de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 foi utilizado como

controle da presença de atividade da gelatinase.

4. Sensibilidade antimicrobiana

O antibiograma dos isolados de *P. shigelloides* foi realizado segundo as recomendações do Clinical Laboratory and Standards Institute (CLSI) na 21ª edição do Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Tests pelo método de difusão de discos (92). O procedimento foi realizado utilizando-se placas com ágar Mueller-Hinton (Difco) e a cepa-padrão de *E. coli* ATCC 25922 foi utilizada como controle no teste.

Todos os isolados foram cultivados e centrifugados a 10.000 rpm por 15 minutos (microcentrífuga 1-14, Sigma, Alemanha). Os sobrenadantes foram descartados e os “pellets” foram ressuspensos em solução salina 0,9% de acordo com o tubo 0,5 da escala de MacFarland (10^8 bactérias/mL). Os “pellets” ressuspensos foram inoculados em placas contendo ágar Mueller-Hinton e os discos de antibióticos foram depositados nas placas. O período de incubação das placas foi de 16 a 18 horas a 35°C.

Neste ensaio de sensibilidade antimicrobiana dos isolados de *P. shigelloides* foram utilizados 17 antibióticos de 10 classes (Laborclin): aminoglicosídeos: amicacina 30 µg (AK), gentamicina 10 µg (GN) e tobramicina 10 µg (TM); cefalosporinas: cefalotina 30 µg (CF), cefotaxima 30 µg (CTX), ceftazidima 30 µg (CAZ) e ceftriaxona 30 µg (CRO); fencóis: cloranfenicol 30 µg (CLO); fluoroquinolonas: ciprofloxacina 5 µg (CIP) e norfloxacina 10 µg (NOR); monobactâmicos: aztreonam 30 µg (ATM); penicilinas: ampicilina 10 µg (AM) e penicilina 10 µg (P); nitrofuranos: nitrofurantoína 300µg (FT); quinolonas: ácido nalidíxico 30 µg (NA); sulfonamidas: trimetoprim-sulfametoxazol 25 µg (STX) e tetraciclina: tetraciclina 30 µg (TE).

De acordo com o tamanho de cada halo, a cepa foi classificada como sensível (S), intermediária (I) ou resistente (R) ao antimicrobiano testado. O padrão interpretativo do tamanho dos halos, para cada antibiótico utilizado, está detalhado na tabela 1 (92).

Tabela 1 – Padrão interpretativo das zonas de inibição dos antibióticos utilizados. * Concentração do disco.

Antimicrobianos	Símbolo	Conc. disco*	Zona de inibição (mm)		
			Sensível	Intermediário	Resistente
Ácido nalidíxico	NA	30 µg	≥ 19	14 - 18	≥ 13
Amicacina	AK	30 µg	≥ 17	15 - 16	≥ 14
Ampicilina	AM	10 µg	≥ 17	14 - 16	≥ 13
Aztreonam	ATM	30 µg	≥ 21	18 - 20	≥ 17
Cefalotina	CF	30 µg	≥ 18	15 - 17	≥ 14
Cefotaxima	CTX	30 µg	≥ 26	23 - 25	≥ 22
Ceftazidima	CAZ	30 µg	≥ 21	18 - 20	≥ 17
Ceftriaxona	CRO	30 µg	≥ 23	20 - 22	≥ 19
Ciprofloxacina	CIP	5 µg	≥ 21	16 - 20	≥ 15
Cloranfenicol	CLO	30 µg	≥ 18	13 - 17	≥ 12
Gentamicina	GN	10 µg	≥ 15	13 - 14	≥ 12
Nitrofurantoína	FT	300 µg	≥ 17	15 - 16	≥ 14
Norfloxacina	NOR	10 µg	≥ 17	13 - 16	≥ 12
Sulfametoxazol	STX	25 µg	≥ 16	11 - 15	≥ 10
Tetraciclina	TE	30µg	≥ 15	12 - 14	≥ 11
Tobramicina	TM	10 µg	≥ 15	13 - 14	≥ 12
Penicilina	P	10 µg	≥ 15	-	≥ 14

5. Resultados

5.1 Teste de citotoxicidade

A tabela 2 mostra que os sobrenadantes de cultura de sete isolados (87,5%) de *P. shigelloides* causaram efeito citotóxico similar sobre linhagens de células normais como CHO e Vero e, sobre células tumorais como He-La e HEp-2. O efeito citotóxico observado foi a presença de vários vacúolos citoplasmáticos (seta) a partir de 1 hora de incubação (Fig. 1). Alterações subsequentes foram observadas, como a perda das junções celulares, destruição do tapete celular e morte num período total de 24 horas. A amostra 9P3-1 apresentou o maior título de efeito citotóxico em todas as células testadas.

Tabela 2. Atividade citotóxica em células CHO, Vero, He-La e HEp-2

Efeito citotóxico*	Isolados de <i>P. shigelloides</i>							
	1P2-13	1P3-16	8P1-4	8P6-5	9P1-1	9P3-1	9P7-5	ATCC 14029
CHO	64	32	32	32	32	256	128	-
Vero	16	32	8	32	4	128	32	-
He-La	16	8	4	8	8	32	16	-
HEp-2	32	32	16	32	8	64	32	-

*O título expresso é a recíproca da maior diluição que causou efeito citotóxico em cultura de células.

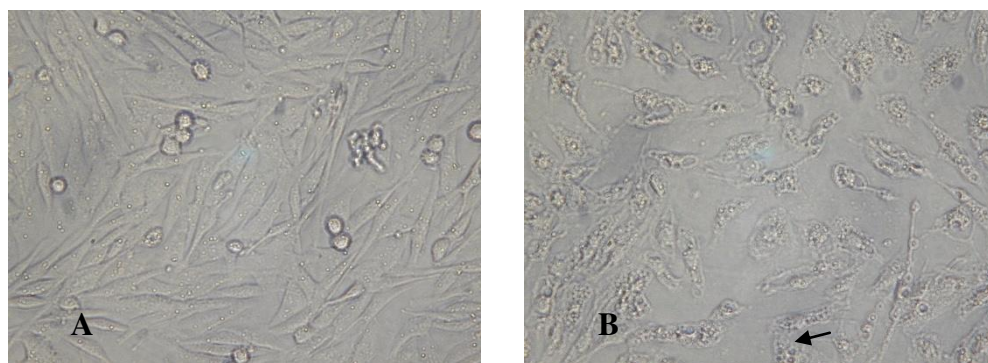
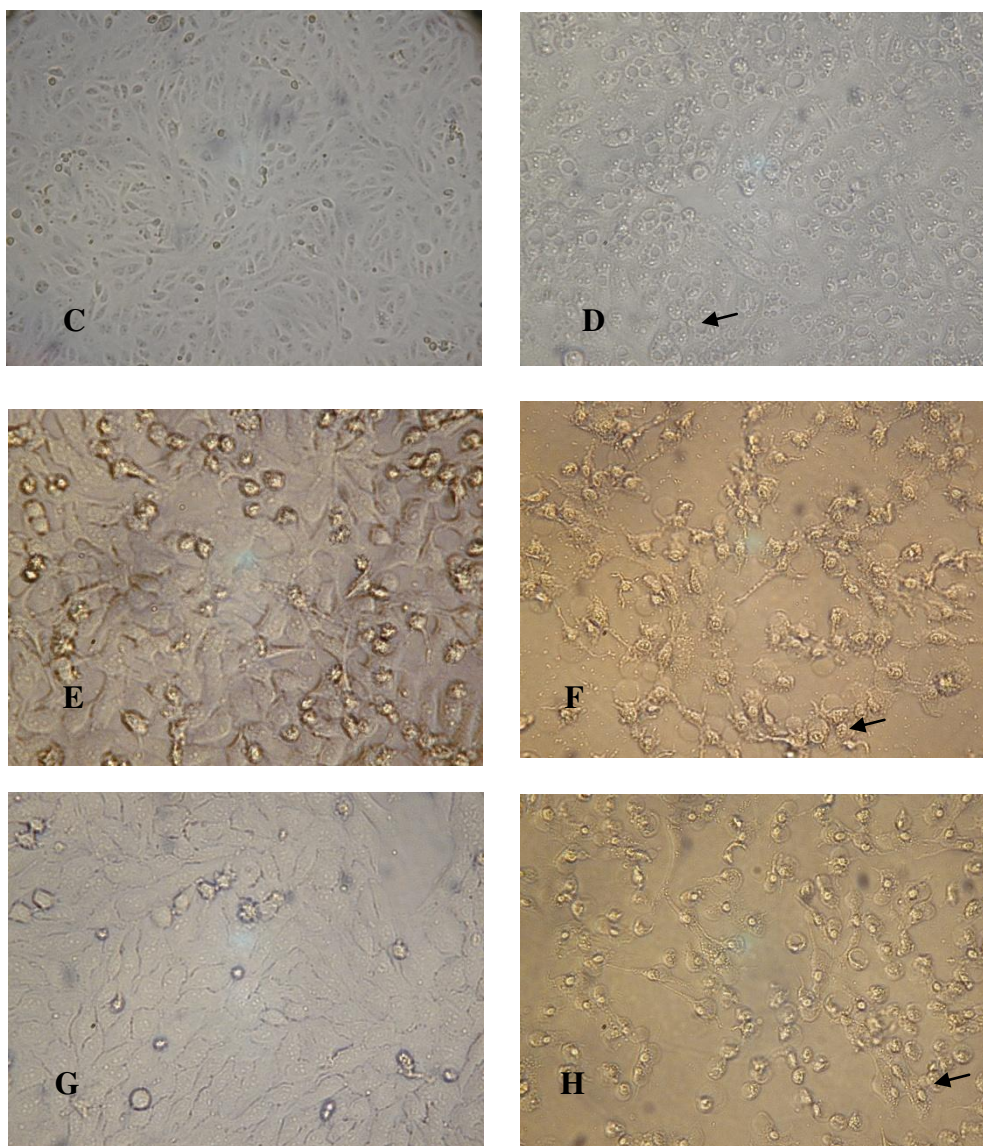


Figura 1 - Efeito citotóxico sobre células induzido pelo sobrenadante de cultivo de *P. shigelloides*, em aumento de 200x. (A); (C); (E) e (G) - células controle CHO, Vero, He-La e HEp-2, respectivamente.



Continuação da figura 1 - (B); (D); (F) e (H) – células CHO, Vero, He-La e HEP-2 tratadas com o sobrenadante do isolado de *P. shigelloides* 9P3-1, respectivamente. Presença de vários vacúolos citoplasmáticos (seta) e perda das junções celulares.

5.1.2 Efeito de proteinase K na atividade citotóxica

Os sobrenadantes de culturas de *P. shigelloides* foram tratados com proteinase K e foi observado que não houve inibição da atividade citotóxica desses sobrenadantes sobre células Vero (tabela 3).

5.2 Detecção da atividade hemolítica

5.2.1 Hemólise em placa com ágar sangue

Sete (87,5%) isolados de *P. shigelloides* produziram halo visível de hemólise em placas com ágar sangue contendo hemácias de carneiro. No entanto, a hemólise não foi observada no teste com os sobrenadantes dos cultivos bacterianos (tabela 4).

5.2.2 Hemólise em microplacas

A lise de hemácias em microplaca foi observada em sete (87,5%) isolados de *P. shigelloides* e seus respectivos sobrenadantes (tabela 5). A atividade hemolítica foi definida como a recíproca da maior diluição que causou lise em 50% das hemácias, sendo que as amostras 1P3-16 e 9P3-1 apresentaram os maiores títulos de atividade hemolítica.

Tabela 3. Atividade citotóxica em células Vero

Efeito citotóxico*	Isolados de <i>P. shigelloides</i>							
	1P2-13	1P3-16	8P1-4	8P6-5	9P1-1	9P3-1	9P7-5	ATCC 14029
Sobrenadante tratado com proteinase K	16	8	16	32	2	64	32	-
Sobrenadante não tratado com proteinase K	16	16	16	32	4	64	32	-

*O título expresso é a recíproca da maior diluição que causou efeito citotóxico em cultura de células.

Tabela 4. Atividade hemolítica em placas com ágar sangue

5% hemácias carneiro	Isolados de <i>P. shigelloides</i>							
	1P2-13	1P3-16	8P1-4	8P6-5	9P1-1	9P3-1	9P7-5	ATCC 14029
Cultivo bacteriano	+	+	+	+	+	+	+	-
Sobrenadante	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabela 5. Atividade hemolítica em microplacas

1% hemácias carneiro	Isolados de <i>P. shigelloides</i>							
	1P2-13	1P3-16	8P1-4	8P6-5	9P1-1	9P3-1	9P7-5	ATCC 14029
Cultivo bacteriano*	16	64	16	32	4	128	16	-
Sobrenadante*	4	16	4	4	2	32	4	-

*O título expresso é a recíproca da maior diluição que causou hemólise em hemácias

5.3 Ensaio de termoestabilidade

Os sobrenadantes dos cultivos de *P. shigelloides* que foram submetidos a temperaturas de 56 e 100°C por 15 minutos neste estudo, não induziram efeito de citotoxicidade sobre células Vero e não apresentaram atividade hemolítica em microplaca.

5.4 Formação de biofilme *in vitro*

Neste ensaio, a formação de biofilme em superfície inerte (microplaca de poliestireno) foi observada em sete (87,5%) isolados de *P. shigelloides*. Não foi detectada a formação de biofilme do isolado de *P. shigelloides* ATCC 14029 (tabela 6).

5.5 Ensaio de adesão em células HEp-2

No ensaio de aderência em células HEp-2, foi observada a adesão de sete (87,5%) isolados de *P. shigelloides* e o isolado ATCC 14029 não apresentou adesão à superfície dessas células (tabela 7). A adesão sobre as células ocorreu a partir de 30 minutos e pode-se observar também a aderência dos isolados de *P. shigelloides* sobre lamínula (fig. 2). Após 90 minutos observou-se os efeitos citotóxicos sobre as células e consequente morte.

Tabela 6. Formação de biofilme *in vitro*

Biofilme	Isolados de <i>P. shigelloides</i>							
	1P2-13	1P3-16	8P1-4	8P6-5	9P1-1	9P3-1	9P7-5	ATCC 14029
	+	+	+	+	+	+	+	-

Tabela 7. Adesão em células HEp-2

Adesão	Isolados de <i>P. shigelloides</i>							
	1P2-13	1P3-16	8P1-4	8P6-5	9P1-1	9P3-1	9P7-5	ATCC 14029
	+	+	+	+	+	+	+	-

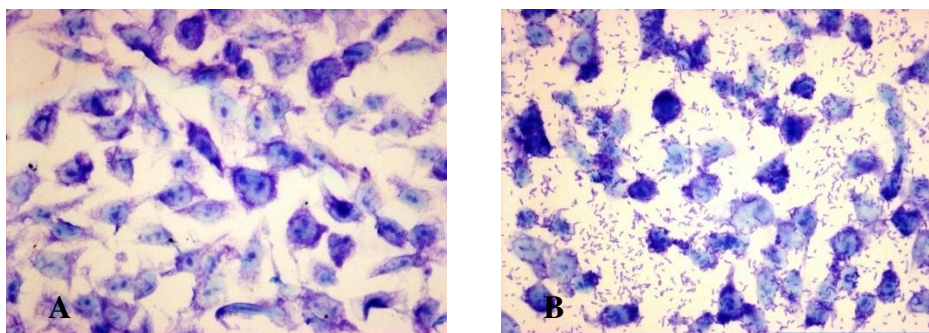


Figura 2 - Adesão do isolado de *P. shigelloides* 9P3-1 em células HEp-2 em aumento de 400x. (A) - células controle HEp-2; (B) – bactérias aderidas em células após 30 minutos.

5.5.1 Ensaio de adesão em plástico e vidro

A aderência a superfícies de plástico (microplaca de poliestireno) e de vidro (lamínula) foi observada em sete (87,5%) isolados de *P. shigelloides*. O isolado de ATCC 14029 foi o único que não apresentou adesão a essas superfícies (tabela 8). A figura 3 mostra a adesão de 2 isolados de *P. shigelloides* em superfície de vidro.

5.6 Estudo das alterações celulares

O ensaio com o corante de Azul de Toluidina permitiu a visualização dos efeitos citotóxicos sobre células Vero, após a aplicação do sobrenadante de cultura do isolado de *P. shigelloides* 9P3-1. Na figura 4, após o período de 2 horas, observou-se a presença de vários vacúolos citoplasmáticos (seta) e perda de junções celulares.

Tabela 8. Adesão em superfície de plástico e de vidro

Adesão	Isolados de <i>P. shigelloides</i>							
	1P2-13	1P3-16	8P1-4	8P6-5	9P1-1	9P3-1	9P7-5	ATCC 14029
	+	+	+	+	+	+	+	-

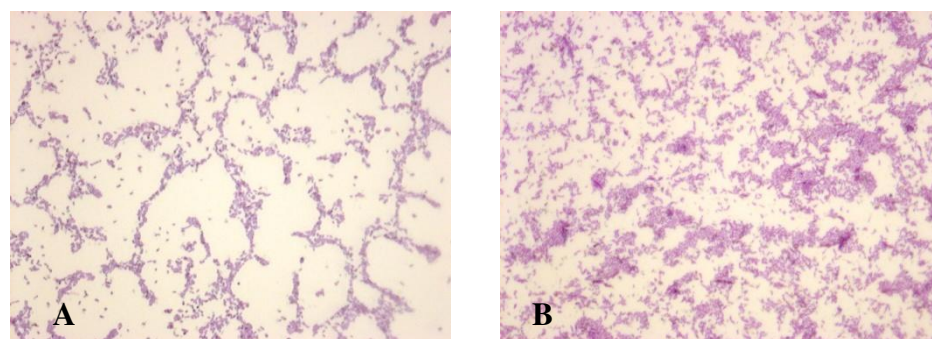


Figura 3 - Adesão de isolados de *P. shigelloides* em superfície de vidro (lamínula) em aumento de 400x. (A) – adesão do isolado 8P6-5; (B) – adesão de isolado 9P1-1.

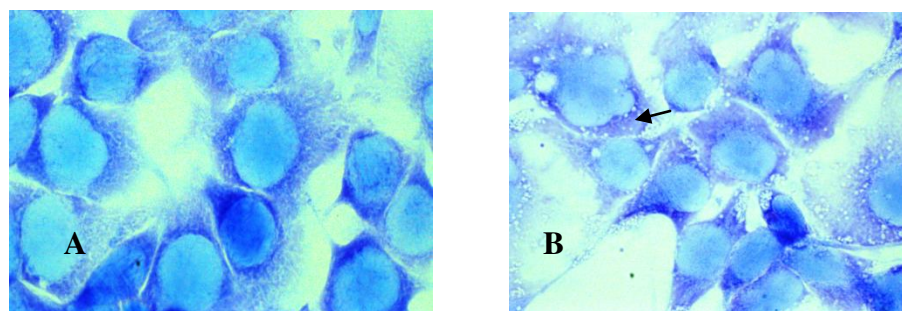


Figura 4 – Efeito citotóxico sobre células Vero induzido pelo sobrenadante de cultivo de *P. shigelloides*, em aumento de 1000x. (A) – células controle Vero; (B) – células Vero tratadas com o sobrenadante de cultivo do isolado de *P. shigelloides* 9P3-1. Observa-se a presença de vários vacúolos citoplasmáticos (seta) e perda das junções celulares.

5.7 Detecção de atividade enzimática

A atividade de enzimas extracelulares foi detectada nos isolados de *P. shigelloides* (tabela 9), sendo que sete isolados (87,5%) foram positivos para lipase, quatro (50%) foram positivos para caseinase, três (37,5%) para elastase e, nenhum isolado foi positivo para gelatinase (fig. 5). No isolado ATCC 14029 não foi detectado a atividade das enzimas acima mencionadas, no entanto os isolados 1P3-16, 8P1-4 e 8P6-5 foram positivos para lipase, caseinase e elastase. Os sobrenadantes de todos os isolados foram negativos quanto à detecção dessas enzimas.

Tabela 9. Detecção de atividade enzimática

Enzimas extracelulares	Isolados de <i>P. shigelloides</i>							
	1P2-13	1P3-16	8P1-4	8P6-5	9P1-1	9P3-1	9P7-5	ATCC 14029
Caseinase	-	+	+	+	-	-	+	-
Elastase	-	+	+	+	-	-	-	-
Gelatinase	-	-	-	-	-	-	-	-
Lipase	+	+	+	+	+	+	+	-

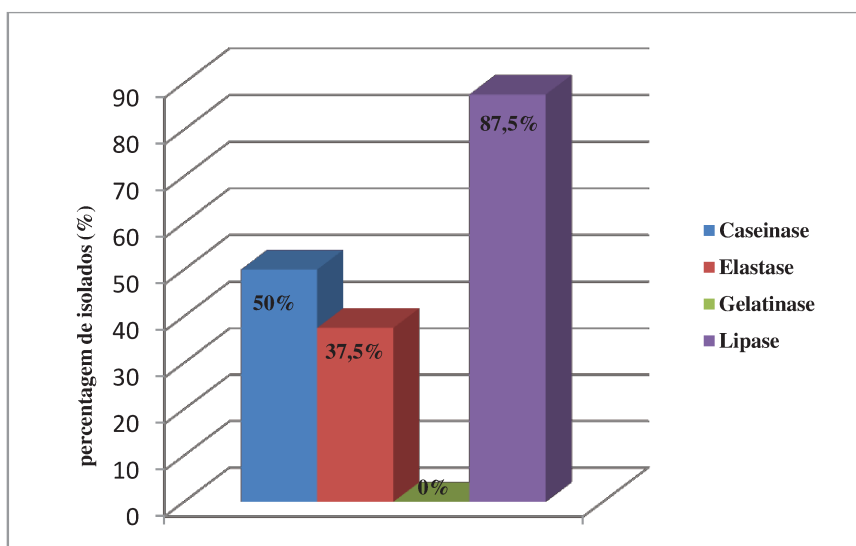


Figura 5 - Distribuição de isolados de *P. shigelloides* quanto à detecção de enzimas extracelulares.

5.8 Sensibilidade antimicrobiana

No presente estudo, foram utilizados 17 antibióticos de 9 classes (tabela 10) para verificar a sensibilidade antimicrobiana dos isolados de *P. shigelloides*, usando o método de difusão de discos em ágar. A sensibilidade a aminoglicosídeos como amicacina, gentamicina e tobramicina foi verificada em oito isolados (100%). Em relação a cefalosporinas foi observado: oito isolados (100%) foram sensíveis a ceftazidima e ceftriaxona; sete (87,5%) apresentaram sensibilidade a cefalotina e cefotaxima; um isolado (23,5%) foi intermediário para cefalotina e a resistência a cefotaxima esteve presente em apenas um isolado (23,5%). Oito isolados (100%) foram sensíveis a fluoroquinolonas como ciprofloxacina e norfloxacina; aztreonam; nitrofurantoína, trimetoprim-sulfametoxazol e a tetraciclina. Em sete isolados (87,5%) foi observada a sensibilidade ao ácido nalidíxico e cloranfenicol. A resistência a penicilina e ampicilina foi verificada em oito (100%) e seis (75%) isolados, respectivamente (tabela 11). A multirresistência foi observada no isolado de *P. shigelloides* 1P3-16, conforme tabela 12.

Tabela 10. Sensibilidade antimicrobiana dos isolados de *P. shigelloides*

Antimicrobianos	Isolados de <i>P. shigelloides</i>							
	1P2-13	1P3-16	8P1-4	8P6-5	9P1-1	9P3-1	9P7-5	ATCC 14029
Ácido nalidíxico	S	R	S	S	S	S	S	S
Amicacina	S	S	S	S	S	S	S	S
Ampicilina	S	R	R	R	S	R	R	R
Aztreonam	S	S	S	S	S	S	S	S
Cefalotina	S	S	I	S	S	S	S	S
Cefotaxima	S	R	S	S	S	S	S	S
Ceftazidima	S	S	S	S	S	S	S	S
Ceftriaxona	S	S	S	S	S	S	S	S
Ciprofloxacina	S	S	S	S	S	S	S	S
Cloranfenicol	S	R	S	S	S	S	S	S
Gentamicina	S	S	S	S	S	S	S	S
Nitrofurantoína	S	S	S	S	S	S	S	S
Norfloxacina	S	S	S	S	S	S	S	S
Sulfametoxazol	S	S	S	S	S	S	S	S
Tetraciclina	S	S	S	S	S	S	S	S
Tobramicina	S	S	S	S	S	S	S	S
Penicilina	R	R	R	R	R	R	R	R

Tabela 11. Percentual de isolados de *P. shigelloides* com perfil sensível, intermediário e resistente aos antimicrobianos utilizados

Antimicrobianos	Sensível		Intermediário		Resistente		N (n° total de isolados)
	n	%	n	%	n	%	
Ácido nalidíxico	7	87,5	0	0	1	23,5	8
Amicacina	8	100	0	0	0	0	8
Ampicilina	2	25	0	0	6	75	8
Aztreonam	8	100	0	0	0	0	8
Cefalotina	7	87,5	1	23,5	0	0	8
Cefotaxima	7	87,5	0	0	1	23,5	8
Ceftazidima	8	100	0	0	0	0	8
Ceftriaxona	8	100	0	0	0	0	8
Ciprofloxacina	8	100	0	0	0	0	8
Cloranfenicol	7	87,5	0	0	1	23,5	8
Gentamicina	8	100	0	0	0	0	8
Nitrofurantoína	8	100	0	0	0	0	8
Norfloxacina	8	100	0	0	0	0	8
Sulfametoxazol	8	100	0	0	0	0	8
Tetraciclina	8	100	0	0	0	0	8
Tobramicina	8	100	0	0	0	0	8
Penicilina	0	0	0	0	8	100	8

Tabela 12 – Multirresistência antimicrobiana do isolado de *P. shigelloides* 1P3-16

Multirresistência	Isolados	
	n	%
Ácido nalidíxico, ampicilina, cefotaxina, cloranfenicol e penicilina	1	23,5

6. Discussão

Nas últimas décadas, são vários os relatos de infecções intestinais e extra-intestinais associados à *Plesiomonas shigelloides* (22, 33, 51), no entanto seus fatores de virulência ainda não estão bem definidos (55, 72).

Neste estudo, os sobrenadantes de culturas de *P. shigelloides* apresentaram atividade citotóxica similar sobre linhagens celulares não cancerígenas como CHO e Vero e também sobre células tumorais como He-La e HEp-2. Após 1 hora de incubação foi observada presença de vários vacúolos citoplasmáticos em todas as células testadas. Alterações subsequentes foram observadas como a perda das junções celulares, destruição do tapete celular e morte num período total de 24 horas. Esses dados sugerem que os sobrenadantes dos cultivos de *P. shigelloides* aqui estudados são capazes de induzir efeitos anticarcinogênicos *in vitro*, apesar de apresentarem efeitos citotóxicos em linhagens celulares não cancerígenas.

O ensaio com o corante Azul de Toluidina tem como objetivo a visualização das alterações morfológicas em células induzido por exemplo, por toxinas bacterianas (57, 93). Em nosso estudo utilizamos esse corante e visualizamos efeitos de citotoxicidade induzidos pelo sobrenadante de cultura de *P. shigelloides* sobre células Vero. Após o período de 1 hora, observou-se a presença de vários vacúolos citoplasmáticos. A perda de junções celulares e destruição da camada celular foram as alterações subsequentes observadas.

Neste estudo, os sobrenadantes dos cultivos de *P. shigelloides* foram submetidos a temperaturas de 56 e 100°C por 15 minutos e não induziram efeito de citotoxicidade sobre células Vero. Esse resultado sugere que a atividade citotóxica de *P. shigelloides* apresenta a característica de termolabilidade. No entanto, foi demonstrado por Abbott *et al.* (71) que *P. shigelloides* produz uma citotoxina que se apresentou termoestável quando submetida a temperaturas de 56°C por 30 minutos e 100°C por 10 minutos.

Okawa *et al.* (58) demonstraram que a citotoxina ACRP/LPS produzida por *P. shigelloides* P-1, apresentou redução em aproximadamente 80% da a atividade citotóxica sobre várias linhagens celulares, após tratamento com proteinase K (300 µg/mL) a 37°C por 18 horas. Em nosso estudo, os sobrenadantes dos cultivos de *P. shigelloides* foram tratados com proteinase K (100 µg/mL) a 37°C por 5 horas e, não foi observado inibição da atividade citotóxica desses

sobrenadantes sobre células Vero. Este resultado não é suficiente para afirmar que essa protease inibe a atividade citotóxica de *P. shigelloides*, uma vez que não foram testadas maiores concentrações de proteinase K e maiores tempos de incubação.

Neste estudo, a atividade hemolítica dos cultivos de *P. shigelloides* foi detectada em placas com ágar sangue (meio sólido) e em microplaca (meio líquido) contendo hemácias de carneiro. A atividade hemolítica também foi investigada nos sobrenadantes desses cultivos bacterianos e a lise de hemácias foi detectada somente no ensaio em microplaca. Esse resultado sugere que a atividade hemolítica de *P. shigelloides* parece ser dependente do método de detecção.

Salerno *et al.* (81) reportaram que pouco mais da metade dos seus isolados de *P. shigelloides* apresentaram atividade hemolítica em placas com ágar sangue contendo hemácias bovina e humana. De acordo com Janda e Abbott (70), isolados de *P. shigelloides* apresentaram atividade hemolítica em placas com ágar sangue de carneiro, porco, coelho e boi. Daskaleros *et al.* (69) relataram que a atividade hemolítica de *P. shigelloides* foi detectada em meios líquido ou semi-sólido e não se observou hemólise em placas com ágar sangue. Santos *et al.* (53) demonstraram que a atividade hemolítica extracelular de *P. shigelloides*, foi detectada quando a bactéria foi cultivada em meio TSB carente de ferro.

Neste estudo, os sobrenadantes dos cultivos de *P. shigelloides* foram submetidos a temperaturas de 56 e 100°C por 15 minutos e a atividade hemolítica em microplaca não foi detectada. Esse resultado sugere que a atividade hemolítica de *P. shigelloides* apresenta a característica de termolabilidade. Resultado semelhante foi encontrado por Santos *et al.* (53) que reportaram a perda da atividade hemolítica pelo aquecimento 100°C por 10 minutos dos filtrados de culturas de *P. shigelloides*.

A adesão de patógenos a células hospedeiras é um passo fundamental para que ocorra a infecção. Essa adesão é facilitada pela presença de estruturas de superfície, como glicocálice, flagelos ou fímbrias presentes nesses microrganismos. Theodoropoulos *et al.* (55) demonstraram a adesão e também a invasão de *P. shigelloides* em culturas de células Caco-2, através da técnica de microscopia eletrônica de transmissão. Esses autores reportaram a presença de estruturas semelhantes a fímbrias nos isolados de *P. shigelloides*. Tsugawa *et al.* (60) reportaram a adesão e invasão celular por *P. shigelloides* P-1, através da técnica de citometria de

fluxo e também, a capacidade de induzir morte celular por apoptose em células Caco-2, através dos ensaios de TUNEL e fragmentação do DNA. A aderência de *P. shigelloides* P-1 em células Caco-2 foi quase concluída no tempo de 10 minutos após a incubação e, a invasão celular ocorreu num período de 60 minutos após a infecção das células por *P. shigelloides* P-1.

No ensaio de adesão em células HEp-2, realizado neste estudo, os isolados de *P. shigelloides* apresentaram capacidade de adesão sobre as células a partir de 30 minutos e foi observada também a aderência dos isolados sobre a lamínula (vidro). Após 90 minutos observaram-se os efeitos citotóxicos sobre as células. Esse resultado sugere que a capacidade de adesão celular de *P. shigelloides* pode contribuir para sua patogenicidade.

A capacidade da bactéria de aderir em superfícies pode levar à colonização bacteriana de dispositivos médicos implantáveis como, por exemplo, cateteres e sondas, o que pode facilitar a formação de biofilmes. A adesão bacteriana em superfícies inertes depende das características superficiais das bactérias e da natureza do material inerte (94, 95).

Garcia *et al.* (89) reportaram que isolados de *Stenotrophomonas maltophilia* obtidos de amostras clínicas apresentaram capacidade de adesão em superfícies inertes como plástico (microplaca) e vidro (lamínulas). Essa bactéria é considerada um patógeno oportunista e sua ocorrência é comum em casos de colonização e infecção hospitalar. *Enterococcus faecalis* é uma bactéria associada às infecções graves como septicemia, infecções do trato urinário e endocardites infecciosas e que também apresenta resistência a maioria dos antibióticos. A formação de biofilme em placas de poliestireno por amostras de *Enterococcus faecalis* isoladas de casos clínicos foi reportada por Furumura *et al.* (84). Amostras de *P. shigelloides* isoladas de seres humanos e animais produziram biofilme *in vitro* (superfície de vidro) como relatado por Hostacká *et al.* (63).

Neste estudo, os isolados de *P. shigelloides* apresentaram capacidade de adesão em superfícies inertes como plástico (microplaca de poliestireno) e vidro (lamínulas). A formação de biofilme *in vitro* (microplaca de poliestireno) também foi detectada nesses isolados. Os resultados sugerem a hipótese do potencial envolvimento desse patógeno na colonização e formação de biofilmes em diversas condições clínicas (dispositivos médicos, tais como cateteres, próteses e sondas).

Bactérias patogênicas ao homem são produtoras de enzimas extracelulares como proteases

(caseinase, elastase e gelatinase) e lípases (78, 79, 96, 97). Alguns estudos relatam a produção de enzimas extracelulares por *P. shigelloides*. Salerno *et al.* (81) reportaram a detecção de gelatinase e DNase em isolados de *P. shigelloides* de origem ambiental e animal. A lipase foi detectada em todas as amostras de *P. shigelloides* obtidas de água, de animais e de fezes diarreicas humanas como relatado por Ciznár *et al.* (98). Santos *et al.* (53) relataram que a atividade da elastase foi detectada em isolados de *P. shigelloides* quando cultivados em meio de cultura pobre em ferro.

Neste estudo, exoenzimas como lípase e proteases tais como, caseinase e elastase foram detectadas nos isolados de *P. shigelloides*. A gelatinase não foi detectada em nossos isolados. Esses resultados sugerem que a produção de exoenzimas hidrolíticas por *P. shigelloides* possa contribuir para a patogenicidade dessa bactéria.

São vários os relatos de *P. shigelloides* como agente causal de infecções intestinais e extra-intestinais em seres humanos (22, 24, 27, 44, 99). Os casos de diarreia aguda por *P. shigelloides* são geralmente auto-limitada e, a terapia antimicrobiana é necessária em casos mais graves de diarreia (34), em casos de pacientes imunossuprimidos e nos casos de infecções extra-intestinais (36, 37, 39).

Neste estudo, no teste de sensibilidade antimicrobiana usando o método de difusão de discos em ágar, todos os isolados de *P. shigelloides* apresentaram sensibilidade a aminoglicosídeos como amicacina, tobramicina e gentamicina. Este resultado é semelhante ao encontrado por Clark *et al.* (100) que observaram a sensibilidade a estes aminoglicosídeos na maioria das amostras de *P. shigelloides*. No entanto, Kain e Kelly (21) reportaram a presença de vários isolados de *P. shigelloides* com resistência a esses aminoglicosídeos.

Neste estudo, a sensibilidade a cefalosporinas foi verificada nos isolados de *P. shigelloides*: 100% dos isolados foram sensíveis a ceftazidima e ceftriaxona e a maioria dos isolados (87,5%) apresentaram sensibilidade a cefalotina e cefotaxima. Estudos de Mondino *et al.* (13) e Clark *et al.* (100) reportaram a sensibilidade a cefalosporinas por *P. shigelloides*. No casos de sepse e meningites por bactérias Gram-negativas, as cefalosporinas podem ser a escolha para o tratamento (35).

Cem por cento dos isolados de *P. shigelloides* neste estudo, foram sensíveis a a tetraciclina, a fluoroquinolonas como ciprofloxacina e norfloxacina; ao monobactâmico, aztreonam; ao nitrofurano, nitrofurantoína; a sulfonamida, trimetoprim-sulfametoxazol. A sensi-

bilidade de *P. shigelloides* a fluoroquinolonas e trimetropim-sulfamtoazol foi reportada por Kain *et al.* (21). Sule (38), reportou a eficiência no tratamento de gastroenterite severa por *P. shigelloides* em uma jovem saudável, com o uso de ceftriaxona e ciproflaxina via intravenosa e oral, respectivamente. Alguns estudos reportam que para o tratamento de diarreia por bactérias, os agentes orais comumente usados são trimetoprim, norfloxacina e ciprofloxacina (21, 101).

A sensibilidade ao ácido nalidixico e clorafenicol foi observada na maioria dos isolados (87,5%) de *P. shigelloides* no presente estudo. Clark *et al.* (100) demonstraram que 100% das amostras de *P. shigelloides* estudadas foram sensíveis ao ácido nalidixico. E ainda, Tseng *et al.* (24) observaram que 82% das amostras de *P. shigelloides* foram sensíveis ao clorafenicol.

Observamos também neste estudo que *P. shigelloides* foi resistente a penicilina e ampicilina em 100% e 75% dos isolados, respectivamente. Vários estudos reportaram a resistência de *P. shigelloides* a penicilinas (13, 24, 29, 36, 99).

Neste estudo, no teste de susceptibilidade antimicrobiana, os isolados de *P. shigelloides* se mostraram sensíveis a maioria dos antibióticos utilizados, sendo que a possível utilização desses agentes antimicrobianos possa ser eficiente no tratamento de infecções por *P. shigelloides*.

Entretanto, outros testes de sensibilidade antimicrobiana, tais como o ensaio da microdiuição e/ou macrodiuição, difusão por fitas Etest®, deveriam ser realizados a fim de se determinar a CIM e/ou confirmar a sensibilidade dos métodos, assegurando dessa forma uma terapia antibiótica eficiente em casos de confirmação de diagnóstico clínico microbiológico.

7. Conclusões

- 1- Isolados de *Plesiomonas shigelloides* são capazes de induzir efeitos anticarcinogênicos *in vitro*, apesar de apresentarem efeitos citotóxicos em linhagens celulares não cancerígenas.
- 2- A atividade citotóxica e hemolítica de *Plesiomonas shigelloides* apresenta característica de termolabilidade.
- 3- Os isolados de *P. shigelloides* aderiram a superfícies celular e inerte (plástico e vidro) e formaram biofilme *in vitro*, sendo possível a colonização e formação de biofilmes em células epiteliais e em dispositivos médicos implantáveis como cateteres, próteses e sondas.
- 4- A produção de exoenzimas hidrolíticas por *P. shigelloides* pode contribuir para a patogenicidade dessa bactéria.
- 5- Os isolados de *P. shigelloides* se mostraram sensíveis à maioria dos antibióticos utilizados. Entretanto, outros testes de sensibilidade antimicrobiana se tornam necessários a fim de se determinar a CIM e/ou confirmar a sensibilidade dos métodos, assegurando dessa forma uma terapia antibiótica eficiente em casos de confirmação de diagnóstico clínico microbiológico.
- 6- Os isolados de *P. shigelloides* aqui estudados produziram um ou mais fatores de virulência que podem estar envolvidos na sua patogenicidade.

8. Referências

1. Ferguson WW, Henderson ND. Description of strain C27: A motile organism with the major antigen of *Shigella sonnei* phase I. J Bacteriol. 1947; 54(2): 179-181.
2. González-Rey C, Svenson S B, Bravo L, Siitonen A, Pasquale V, Dumontet S, *et al.* Serotypes and anti-microbial susceptibility of *Plesiomonas shigelloides* isolates from humans, animals and aquatic environments in different countries. Comp Immunol Microbiol & Infec Dis. 2004; 27: 129–139.
3. Janda JM. Genus XXXVII. *Plesiomonas* Habs and Schubert 1962. In: Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT, Garrity GM. Bergeys's Manual of Systemic Bacteriology. 2nd. Ed. New York. Springer-Verlag; 2005. vol. 2, parte B. p. 740-744.
4. Ruimy R, Breittmayer V, Elbaze P, Lafay B, Boussemart O, Gauthier M, *et al.* Phylogenetic analysis and assessment of the genera *Vibrio*, *Photobacterium*, *Aeromonas*, and *Plesiomonas* deduced from small-subunit rRNA sequences. Int J Syst Bacteriol. 1994; 44(3): 416-426.
5. Martinez-Murcia AJ, Benlloch S, Collins MD. Phylogenetic interrelationships of members of the genera *Aeromonas* and *Plesiomonas* as determined by 16S ribosomal DNA sequencing: lack of congruence with results of DNA-DNA hybridizations. Int J Syst Bacteriol. 1992; 42(3): 412-421.
6. Huys G, Sings J. Evaluation of fluorescent amplified fragment length polymorphism (FAFLP) methodology for the genotypic discrimination of *Aeromonas* taxa. FEMS Microbiol Let. 1999; 177: 83-92.
7. Salerno A, Delétoile A, Lefevre M, Ciznar I, Krovacek K, Grimont P, *et al.* Recombining population structure of *Plesiomonas shigelloides* (*Enterobacteriaceae*) revealed by multilocus sequence typing. J Bacteriol. 2007; 189 (21): 7808–7818.
8. Kelly MT, Kain KC. Biochemical characteristics and plasmids of clinical and environmental *Plesiomonas shigelloides*. Experientia. 1991; 47: 439–441.
9. Aldova E, Shimada T. New O and H antigens of the International Antigenic Scheme for *Plesiomonas shigelloides*. Folia Microbiol. 2000; 45(4): 301-304.

10. Farinãs LB, Noblet DS, Arce MA, Garcia H, Ramírez M, Cabrera LE, *et al.* Estudio de factores de virulencia en cepas de *Plesiomonas shigelloides* aisladas de animales domésticos y afectivos. *Rev Elet Vet.* 2005; 6 (10): 1-12.
11. Miller ML, Kohburger JA. Evaluation of inositol brilliant green bile salts and *Plesiomonas* agars for recovery of *Plesiomonas shigelloides* from aquatic samples in a seasonal survey of the Suwane river estuary. *J Food Prot.* 1986b; 49: 274–278.
12. Jagger TD. *Plesiomonas shigelloides* – a veterinary perspective. *Infect Dis Rev.* 2000; 2(4): 199–210.
13. Krovacek K, Eriksson LM, González-Rey C, Rosinsky J, Ciznar I. Isolation, biochemical and serological characterization of *Plesiomonas shigelloides* from freshwater in Northern Europe. *Comp Immuno Microbiol Infect Dis.* 2000; 23: 45-51.
14. Mondino SSB, Nunes MP, Ricciardi ID. Occurrence of *Plesiomonas shigelloides* in water environments of Rio de Janeiro city. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1995; 90(1): 1-4.
15. Davis WA, Chretien JH, Garagusi VF, Goldstein M A. Snake-to human transmission of *Aeromonas (Pl) shigelloides* resulting in gastroenteritis. *J South Med.* 1978; 71(4): 474-476.
16. Arai T, Ikejima N, Itoh T, Sakai S, Shimada T, Sakazaki R. A survey of *Plesiomonas shigelloides* from aquatic environments, domestic animals, pets and humans. *J Hyg.* 1980; 84 (2): 203-211.
17. Clark RB, Janda JM. *Plesiomonas* and human disease. *Clin Microbiol Newsl.* 1991; 13(7): 49-52.
18. Islam MS, Alam MJ, Khan SI. Distribution of *Plesiomonas shigelloides* in various components of pond ecosystems in Dhaka, Bangladesh. *Microbiol Immunol.* 1991; 35(11): 927-932.
19. Aldova E, Melter O, Chyle P, Slosarek M, Kodym P. *Plesiomonas shigelloides* in water and fish. *Centr Eur J Publ Health.* 1999; 7(4): 172-175.
20. Gonzalez -Rey C, Svenson S B, Eriksson L M, Ciznár I, Krovacek K. Unexpected finding of the “tropical” bacterial pathogen *Plesiomonas shigelloides* from lake water north of the Polar Circle. *Polar Biol.* 2003; 26: 495-499.
21. Sanyal SC, Singh SJ, Sen PC. Enteropathogenicity of *Aeromonas hydrophila* and *Plesiomonas shigelloides*. *J MedMicrobiol.* 1975; 8: 195-198.

22. Kain K C, Kelly M T. Clinical features epidemiology and treatment of *Plesiomonas shigelloides* diarrhea. J Clin Microbiol. 1989; 27(5): 998-1001
23. Olsvik O, Wachsmuth K, Kay B, Birkness KA, Yi A, Sack B. Laboratory observations on *Plesiomonas shigelloides* strains isolated from children with diarrhea in Peru. J Clin Microbiol. 1990; 28(5): 886-889.
24. Shigematsu M, Kaufmann ME, Charlett A, Niho Y, Pitt TL. An epidemiological study of *Plesiomonas shigelloides* diarrhoea among Japanese travellers. Epidemiol Infect. 2000; 125(3), 523-530.
25. Tseng HK, Liu CP, Li WC, Su SC, Lee CM. Characteristics of *Plesiomonas shigelloides* infection in Taiwan. J Microbiol Immunol Infect. 2002; 35: 47-52.
26. Tsukamoto T, Kinoshita Y. Two epidemics of diarrhoeal disease possibly caused by *Plesiomonas shigelloides*. J Hyg. 1978; 80: 275-280.
27. Rutala WA, Sarubi FA Jr, Finch CS, McCormack JN, Steinkraus GE. Oyster-associated outbreak of diarrhoeal disease possibly caused by *Plesiomonas shigelloides*. Lancet. 1982; 739.
28. Bravo L, Cabrera R, Ramirez M, Llop A, Fernández A, Garcia B, *et al.* *Plesiomonas shigelloides* una *Vibrionaceae* en quien pensar. Rev Cub Med Trop. 2000; 52(1): 10-14.
29. Obi CL, Coker AO, Epoke J, Ndip RN. Enteric bacterial pathogens in stools of residents of urban and rural regions in Nigeria: A comparison of patients with and without diarrhoea and controls without diarrhoea. J Diarrho Dis Res. 1997; 15(4): 241-247.
30. Wong TY, Tsui HY, So MK, Lai JY, Lai ST, Tse CWS, *et al.* *Plesiomonas shigelloides* infection in Hong Kong: retrospective study of 167 laboratory-confirmed cases. J Med Hong Kong. 2000; 6 (4): 375-380.
31. Gibotti A, Saradakis HO, Pelayo JS, Tagliari KC, Falcão DP. Prevalence and virulence properties of *Vibrio cholera* non-01, *Aeromonas* spp. and *Plesiomonas shigelloides* isolated from Cambé Stream (State of Paraná, Brazil). J Appl Microbiol. 2000; 89: 70-75.
32. Miller ML, Kohburger JA. *Plesiomonas shigelloides*: an opportunistic food and waterborne pathogen. J Food Prot. 1985; 48(5): 449-457.

33. Holmberg SD, Wachsmuth K, Hickman-Brenner FW, Blake PA, Farmer JJ. *Plesiomonas* enteric infections in the United States. *Ann Intern Med.* 1986; 105(5): 690-694.
34. Brenden RA, Miller MA, Janda JM. Clinical disease spectrum and pathogenic factors associated with *Plesiomonas shigelloides* infection in humans. *Rev Infect Dis.* 1988; 10(2): 303-316.
35. Rolston KV, Hopfer RL. Diarrhea due to *Plesiomonas shigelloides* in cancer patients. *J Clin Microbiol.* 1984; 20(3): 597-598.
36. Ingram CW, Junior AJM, Levitz RE. Gastroenteritis, sepsis, and osteomyelitis caused by *Plesiomonas shigelloides* in an immunocompetent host: case report and review of the literature. *J Clin Microbiol.* 1987; 25(9): 1791-1793.
37. Stock I, Wiedemann B. Natural antimicrobial susceptibilities of *Plesiomonas shigelloides* strains. *J Ant Chem.* 2001; 48: 803-811.
38. Avison M B, Bennett PM, Walsh TR. β -Lactamase expression in *Plesiomonas shigelloides*. *J Ant Chem.* 2000; 45: 877-880.
39. Sule A. Severe *Plesiomonas shigelloides* gastroenteritis in a young healthy patient. *Crit Care & Shock.* 2009; 12: 120-122.
40. Auxiliadora-Martins M, Bellissimo-Rodrigues F, Viana JM, Teixeira JC, Nicolini EA, *et al.* Septic shock caused by *Plesiomonas shigelloides* in a patient with sickle beta-zero thalassemia. *Heart & Lung.* 2010; 39 (4): 335-339.
41. Eason JD, Peacock D. *Plesiomonas shigelloides* septicemia and meningitis in a neonate. *Can J Infect Dis.* 1996; 7(6): 380-382.
42. Paul R, Siitonen A, Karkainen P. *Plesiomonas shigelloides* bacteremia in a healthy girl with mild gastroenteritis. *J Clin Microbiol.* 1990; 28(6): 1445-1446.
43. Bravo L, Cabrera R, Ramírez M, Llop A, Fernández A, Concepción A, *et al.* Fatal *Plesiomonas shigelloides* in a newborn. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1999; 94(5): 661-662.

44. Henderson DP, Wyckoff EE, Rashidi CE, Verlei H, Oldham AL. Characterization of the *Plesiomonas shigelloides* genes encoding the heme iron utilization system. *J Bacteriol.* 2001; 183(9): 2715-2723.
45. Schneider F, Lang N, Reibke R, Michaely HJ, Hiddemann W, Ostermann H. *Plesiomonas shigelloides* pneumonia. *Med Mal Inf.* 2009; 39: 397-400.
46. Nolte FS, Poole RM, Murphy GW, Clark C, Panner BJ. Proctitis and fatal septicemia caused by *Plesiomonas shigelloides* in a bisexual man. *J Clin Microbiol.* 1988; 26(2): 388-391.
47. Delforge ML, Devriendt J, Glupczynski Y, Hansen W, Douat N. *Plesiomonas shigelloides* septicemia in a patient with primary hemochromatosis. *Clin Infect Dis.* 1995; 21: 692-3.
48. Riley PA, Parasakthi N, Abdullah WA. *Plesiomonas shigelloides* bacteremia in a child with leukemia. *Clin Infect Dis.* 1996; 23: 206-207.
49. Lee A C W, Yuen K Y, Ha S Y, Chiu D C K, Lau YL. *Plesiomonas shigelloides* septicemia: case report and literature review. *Pediatr Hematol Oncol.* 1996; 13(3): 265-269.
50. Dham LJ, Weinberg AG. *Plesiomonas (Aeromonas) shigelloides* septicemia and meningitis in a neonate. *J Med Southern.* 1980; 73(3): 393-394.
51. Herrington DA, Tzipori S, Robins-Browne RM, Tall BD, Levine MM. *In vitro* and *in vivo* pathogenicity of *Plesiomonas shigelloides*. *Infect Immun.* 1987; 55(4): 979-985.
52. Janda JM, Abbott SL. Expression of hemolytic activity by *Plesiomonas shigelloides*. *J Clin Microbiol.* 1993; 31(5): 1206-1208.
53. Santos JA, González CJ, López TM, Otero A, Garcia-López ML. Hemolytic and elastolytic activities influenced by iron in *Plesiomonas shigelloides*. *J Food Prot.* 1999; 62(12): 1475-1477.
54. Gardner SE, Fowlston SE, George WL. *In vitro* production of cholera toxin-like activity by *Plesiomonas shigelloides*. *J Infect Dis.* 1987; 156(5): 720-722.
55. Theodoropoulos C, Wong TH, O'Brien M, Stenzel D. *Plesiomonas shigelloides* enters polarized human intestinal Caco-2 cells in an *in vitro* model system. *Infect Immun.* 2001; 69(4): 2260-2269.

56. Baratéla KC, Saridakis HO, Gaziri LCJ, Pelayo JS. Effects of medium composition, calcium, iron and oxygen on hemolisin production by *Plesiomonas shigelloides* isolated from water. J Appl Microbiol. 2001; 90: 482-487.
57. Falcón R, Carbonell GV, Figueiredo PMS, Butião F, Saridakis HO, Pelayo JS, et al. Intracellular vacuolation induced by culture filtrates of *Plesiomonas shigelloides* isolated from environmental sources. J Appl Microbiol. 2003; 95: 273-278.
58. Okawa Y, Ohtomo Y, Tsugawa H, Matsuda Y, Kobayashi H, Tsukamoto T. Isolation and characterization of a cytotoxin produced by *Plesiomonas shigelloides* P-1 strain. FEMS Microbiol Lett. 2004; 239: 125-130.
59. Fariñas LB, Almeida OSP, Mesa JM, Álvarez MR, Rodríguez BG. Susceptibilidad antimicrobiana y aislamiento de plásmidos en *Plesiomonas shigelloides*. Rev Cub Med Trop. 1998; 50(3): 203-206.
60. Tsugawa H, Ono T, Murakami H, Okawa Y. Invasive phenotype and apoptosis induction of *Plesiomonas shigelloides* P-1 strain to Caco-2 cells. J Appl Microbiol. 2005; 99: 1435-1443.
61. Vitovec J, Aldova E, Vladik P, Krovacek K. Enteropathogenicity of *Plesiomonas shigelloides* and *Aeromonas* spp. in experimental mono- and coinfection with *Cryptosporidium parvum* in the intestine of neonatal BALB/mice. Comp Immunol Microbiol Infect Dis. 2001; 24: 39-55.
62. Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. Clin Microbiol Rev. 2002; 15(2): 167-193.
63. Hostácka A, Ciznár I, Rosinsky J. Biological characteristics of *Plesiomonas shigelloides* strains of human and animal origin. Epidemiol Mikrobiol Imunol. 2005; 54(4): 148-153.
64. Sanyal SC, Saraswathi B, Sharma P. Enteropathogenicity of *Plesiomonas shigelloides*. J Med Microbiol. 1980; 13: 401-409.
65. Manorama TV, Agarwal RK, Sanyal SC. Enterotoxins of *Plesiomonas shigelloides*: partial purification and characterization. Toxicon Suppl. 1983; 3: 269-272.
66. Matthews BG, Douglas H, Guiney DG. Production of a heat stable enterotoxin by *Plesiomonas shigelloides*. Microbial Pathog. 1988; 5: 207-213.

67. Finlay BB, Falkow S. Common themes in microbial pathogenicity. *Microbiol Rev.* 1989; 53(2): 210-230.
68. Jürgens D; Özel M; Takaisi-Kikuni N B. Production and characterization of *Escherichia coli* enterohemolysin and its effects on the structure of erythrocyte membranes. *Cell Biol Int.* 2002; 26(2): 175-186.
69. Daskaleros PA, Stoebner JA, Payne SM. Iron uptake in *Plesiomonas shigelloides*: cloning of the genes for the heme-iron uptake system. *Infect Immun.* 1991; 59(8): 2706-2711.
70. Janda A, Abbott SL. Expression of hemolytic activity by *Plesiomonas shigelloides*. *J Clin Microbiol.* 1993; 31(5): 1206-1208.
71. Abbott SL, Kokka RP, Janda JM. Laboratory investigations on the low pathogenic potential of *Plesiomonas shigelloides*. *J Clin Microbiol.* 1991; 29(1): 148-153.
72. Gardner SE, Fowlston SE, George WL. Effect of iron on production of a possible virulence factor by *Plesiomonas shigelloides*. *J Clin Microbiol.* 1990; 28(4): 811-813.
73. Falcón RM, Carvalho HF, Joazeiro PP, Gatti MSV, Yano T. Induction of apoptosis in HT29 human intestinal epithelial cells by the cytotoxic enterotoxin of *Aeromonas hydrophila*. *Biochem Cell Biol.* 2001; 79: 525-531.
74. Dubreuil JD. *Escherichia coli* STb enterotoxin. *Microbiology.* 1997; 143: 1783-1795.
75. Pemberton JM, Kidd SP, Schmidt R. Secreted enzymes of *Aeromonas*. *FEMS Microbiol Let.* 1997; 154: 1-10.
76. Rust L, Messing CR, Iglewski B H. Elastase Assays. *Methods Enzimol.* 1994; 235:561-562.
77. Lantz MS, Ciborowski P. Zymographic techniques for detection and characterization of microbial proteases. *Methods Enzimol.* 1994; 235: 561-562.
78. Rollof J, Vinge E, Nilsson-Ehle P, Braconier JH. Aggregation of human granulocytes by *Staphylococcus aureus* lipase. *J Med Microbiol.* 1992; 36: 52-55.

79. Strauss DC, Lonon MK, Hutson JC. Inhibition of rat alveolar macrophage phagocytic function by a *Pseudomonas cepacia* lipase. *J Med Microbiol.* 1992; 37: 335-340.
80. Boriollo MFG, Bassi RC, Nascimento CMGS, Feliciano LM, Francisco SB, Barros LM, Spolidório LC, Spolidório DMP. Distribution and hydrolytic enzyme characteristics of *Candida albicans* strains isolated from diabetic patients and their non-diabetic consorts. *Oral Microbiol Immunol.* 2009; 24: 437-450.
81. Salerno A, Ciznár I, Krovacek K, Conte M, Dumontet S, González-Rey C, *et al.* Phenotypic characterization and putative virulence factors of human, animal and environmental isolates of *Plesiomonas shigelloides*. *Folia Microbiol.* 2010, 55(6): 641-647.
82. Ludovico, MS. Purificação e caracterização de uma toxina enterotóxica, citotóxica e letal produzida por amostras de *Plesiomonas shigelloides* isoladas de água de rio [Tese - Doutorado]. Universidade de São Paulo; 2008.
83. Mello, MLS e Vidal, BC. *Práticas em Biologia Celular.* Edgard Blucher. Rio de Janeiro. 1980, p. 71.
84. Furumura MT; Figueiredo PMS; Carbonell GV; Darin ALC; Yano T. Virulent-associated characteristics of *Enterococcus faecalis* strains isolated from clinical sources. *Braz J Microbiol.* 2006; 37: 230-236.
85. Morgan DR, Johnson PC, DuPont HL, Satterwhite TK, Wood LV. Lack of correlation between known virulence properties of *Aeromonas hydrophila* and enteropathogenicity for humans. *Infect Immun.* 1985; 50(1): 62-65.
86. Burke V, Cooper M, Robinson J. Haemagglutination patterns of *Aeromonas* spp. related to species and source of strains. *Aust J Exp Biol Med Sci.* 1986; 64(6): 563-570.
87. Wakimoto N, Nishi J, Sheikh J, Nataro JP, Sarantuya J, Iwashita M, *et al.* Quantitative biofilm assay using a microtiter plate to screen for enteroaggregative *Escherichia coli*. *Am J Trop Med Hyg.* 2004; 71(5): 687-690.
88. Scaletsky ICA, Silva ML, Trabulsi LR. Distinctive patterns of adherence of *Escherichia coli* to HeLa cells. *Infect Immun.* 1984; 45(2): 534-536.
89. Garcia DO, Timenetsky J, Martinez MB, Francisco W, Sinto SI, Yanaguita M. Proteases (caseinase and elastase), hemolysins, adhesion and susceptibility to antimicrobials of *Stenotrophomonas maltophilia* isolates obtained from clinical specimens. *Braz J Microbiol.* 2002; 33: 157-162.

90. Gupta R, Gupta N, Rathi P. Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2004; 64: 763–781.
91. Vergis EN, Shankar N, Chow JW, Hayden MK, Snyderman DR, Zervos MJ, *et al.* Association between the presence of enterococcal virulence factors gelatinase, hemolysin, and enterococcal surface protein and mortality among patients with bacteremia due to *Enterococcus faecalis*. *Clin Infect Dis.* 2002; 35: 570-575.
92. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-First Informational Supplement. CLSI document M100-S21. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA; 2011.
93. Martins LM, Catani CF, Fálcon RM, Carbonell GV, Azzoni AA, Yano T. Induction of apoptosis in Vero by *Aeromonas veronii* sobria vacuolating cytotoxic factor. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2007; 49: 197-204.
94. Christensen GD, Baldassari L, Simpson WA. Methods for studying microbial colonization of plastics. *Method Enzimol.* 1995; 253: 477-500.
95. Habash M, Reid G. Microbial Biofilms: their development and significance for medical device-related infections. *J Clin Pharmacol.* 1999; 39: 887-898.
96. König B, Jaeger KE, Sage AE, Vasil ML, König W. Role of *Pseudomonas aeruginosa* lipase in inflammatory mediator release from human inflammatory effector cells (platelets, granulocytes, and monocytes). *Infect Immu.* 1996; 64(8): 3252–3258.
97. Waldon E, Sobis-Glinkowska M, Szewczyk E M. Evaluation of selected features of *Staphylococcus cohnii* enabling colonization of humans. *Folia Microbiol.* 2002; 47(5): 565-571.
98. Ciznár I, Hostacká A, Gonzalez-Rey C, Krovaceck K. Potential virulence-associated properties of *Plesiomonas shigelloides* strains. *Folia Microbiol.* 2004; 49(5): 543-548.
99. Ramalivhana NJ, Obi CL. *Plesiomonas shigelloides* in stool samples of patients in the Venda Region: possible considerations on pathogenicity and antibiogram profiles. *Afr J Biot.* 2009; 8(22): 6388-6392.

100. Clark BR, Lister PD, Arneson-Rotert L, Janda JM. *In vitro* susceptibilities of *Plesiomonas shigelloides* to 24 antibiotics and antibiotic- β -lactamase-inhibitor combinations. *Ant Ag Chemot.* 1990; 34(1): 159-160.
101. Rogerie F, Ott D, Vandepitte J, Verbist L, Lemmens P, Habiyaremeye I. Comparison of norfloxacin and nalidixic acid for treatment of dysentery caused by *Shigella dysenteriae* type 1 in adults. *Antimicrob Agents Chemother.* 1986; 29(5): 883–886.